



分析用キラルカラム ハンドブック

CHIRALPAK®
CHIRALCEL®
CROWNPAK®

株式会社 **ダイセル**
CPI カンパニー

1 章	耐溶剤型キラルカラム (I シリーズ) 編	
1.1	はじめに	3
1.1.1	カラムの仕様	3
1.1.2	カラム使用条件	3
1.1.3	使用可能溶媒	4
1.1.4	カラム保護パーツ	4
1.1.5	サンプルの前処理	4
1.1.6	装置の洗浄	4
1.1.7	注意事項	4
1.2	移動相の選択	5
1.2.1	分析条件決定までの流れ	5
1.2.2	添加剤の選択	6
1.2.3	溶媒の選択	8
1.3	保持時間の調整	10
1.3.1	移動相の組成	10
1.3.2	カラム温度	10
1.3.3	溶媒の種類	11
1.4	検出器について	12
1.5	カラム使用後のケア	13
1.5.1	カラム洗浄条件とリセット条件	13
1.5.2	カラム保存条件	13
1.6	逆相条件での使用について	14
1.6.1	推奨移動相	14
1.6.2	移動相調製方法 (例)	15
1.7	クロマト集	16
1.7.1	カラムの耐久性	16
1.7.2	有機溶媒 100% 移動相	16
1.7.3	IA カラムで一つの化合物を複数の移動相で分析	17
1.7.4	IB カラムで一つの化合物を複数の移動相で分析	17
1.7.5	短時間分析	18
1.7.6	耐溶剤型シリーズ逆相条件 (有機溶媒変更による影響)	18
1.7.7	耐溶剤型キラルカラム逆相条件での移動相の選択	19
1.7.8	耐溶剤型キラルカラム逆相条件でのカラムスクリーニングの例	19
1.7.9	温度変更による影響 (逆相条件)	19
2 章	コーティング型キラルカラム (順相用) 編	
2.1	はじめに	21
2.1.1	カラムの仕様	21
2.1.2	カラム使用条件	22
2.1.3	使用可能溶媒	22
2.1.4	カラム保護パーツ	22
2.1.5	サンプルの前処理	22
2.1.6	装置の洗浄	22
2.1.7	注意事項	22
2.2	分析条件の決定	23
2.2.1	移動相選定の手順	23
2.2.2	添加剤の選択	24
2.2.3	溶媒の選択	25
2.3	溶媒選択のポイント	25
2.3.1	極性溶媒比率	25
2.3.2	カラム温度	26
2.3.3	溶媒の種類	26
2.4	カラム保存条件	27
3 章	コーティング型キラルカラム (逆相用) 編	
3.1	はじめに	29
3.1.1	カラムの仕様	29
3.1.2	カラム使用条件	30
3.1.3	使用可能溶媒	30
3.1.4	カラム保護パーツ	30
3.1.5	サンプルの前処理	30
3.1.6	装置の洗浄	30
3.1.7	カラムに通液する前に	30
3.1.8	注意事項	30
3.2	移動相の選択	31
3.2.1	移動相選定の手順	31
3.3	推奨移動相条件及び移動相調製方法	32
3.3.1	推奨移動相	32
3.3.2	移動相調製方法 (例)	34
3.4	保持時間の調節	35
3.4.1	有機溶媒比の効果	35
3.4.2	有機溶媒の選択	35
3.4.3	カラム温度の効果	36
3.4.4	移動相の pH 値の影響 (酸性化合物の場合)	36
3.4.5	移動相の pH 値の影響 (塩基性化合物の場合)	37
3.4.6	緩衝液に用いる塩の種類の影響	37

4 章	多糖系キラルカラムのトラブルシューティング編	
4.1	カラムトラブルとその対処法	39
4.2	カラム性能のチェック方法	39
4.3	装置の移動相置換時の注意点	40
4.4	サンプル洗浄液の影響	40
4.5	移動相中の水分の影響	40
4.6	溶媒履歴の影響 (耐溶剤型キラルカラム)	41
4.7	メモリー効果 (コーティング型・耐溶剤型キラルカラム)	41
5 章	クラウンエーテル型キラルカラム編	
5.1	はじめに	43
5.1.1	カラムの仕様	43
5.1.2	カラム使用条件	43
5.1.3	使用可能溶媒	43
5.1.4	推奨移動相条件 (逆相系)	44
5.1.5	推奨移動相条件 (順相系)	45
5.2	分析条件の決定方法	46
5.2.1	分析条件決定フローチャート	46
5.2.2	pH 条件の効果	46
5.2.3	酸性添加剤の選択	47
5.2.4	有機溶媒の選択	47
5.2.5	カラム温度の影響	48
5.2.6	溶出順序の逆転について	48
5.3	CROWNPAK® CR-I を用いた分離例	49
5.3.1	α -アミノ酸、 β -アミノ酸、 γ -アミノ酸	49
5.3.2	アミン、アミノアルコール	49
5.3.3	ペプチド類	50
5.3.4	順相条件での分離例	50
5.4	CRPWNPAPK® CR について	51
5.4.1	カラムの仕様	51
5.4.2	カラム使用条件	51
5.4.3	使用可能溶媒	51
6 章	両性化合物分析用キラルカラム 編	
6.1	はじめに	53
6.1.1	カラムの仕様	53
6.1.2	カラム使用条件	53
6.1.3	カラムの特性	53
6.1.4	注意事項および洗浄・保管方法	53
6.2	分析条件の決定方法	54
6.2.1	一般的な分析条件設定方法	54
6.2.2	溶剤の影響	55
6.2.3	溶出順序の変更	55
6.2.4	LC-MS への応用について	56
6.3	CHIRALPAK® ZWIX を用いた分離例	56
6.3.1	アミノ酸 (フリー体) の分離例	56
6.3.2	誘導体化したアミノ酸の分離例	56
6.3.4	環状2級アミノ酸およびアルキル側鎖を持つアミノ酸の分離例	57
6.3.5	ジペプチド、トリペプチドの分離例	57
6.3.6	その他、分離実績のある化合物	57
7 章	両性化合物分析用キラルカラム 編	
7.1	はじめに	59
7.1.1	カラムの仕様	59
7.1.2	カラム使用条件	59
7.1.3	使用可能溶媒	59
7.1.4	カラム保護パーツ	59
7.1.5	サンプルの前処理	60
7.1.6	装置の洗浄	60
7.1.7	注意事項	60
7.1.8	平衡化	60
7.2	分析条件設定方法	60
7.2.1	移動相の初期条件	60
7.2.2	緩衝液の調整方法	60
7.2.3	移動相	61
7.2.4	試料	61
7.2.5	カラムの洗浄・保管	61
7.3	CHIRALPAK®AGP の分析条件設定方法	62
7.3.1	分析条件設定までの流れ	62
7.3.2	最適化条件の例 (pH)	63
7.3.3	最適化条件の例 (有機溶媒比率)	64
7.3.4	最適化条件の例 (有機溶媒種)	64
7.3.5	最適化条件の例 (バッファー濃度)	65
7.3.6	最適化条件の例 (添加剤種)	65

1章 耐溶剤型キラルカラム(1シリーズ)編

CHIRALPAK® IA / CHIRALPAK® IA-3
CHIRALPAK® IB / CHIRALPAK® IB-3
CHIRALPAK® IC / CHIRALPAK® IC-3
CHIRALPAK® ID / CHIRALPAK® ID-3
CHIRALPAK® IE / CHIRALPAK® IE-3
CHIRALPAK® IF / CHIRALPAK® IF-3

2章 コーティング型キラルカラム(順相用)編

CHIRALPAK® AD-H / CHIRALPAK® AD-3
CHIRALPAK® AS-H / CHIRALPAK® AS-3
CHIRALPAK® AY-H / CHIRALPAK® AY-3
CHIRALPAK® AZ-H / CHIRALPAK® AZ-3
CHIRALCEL® OD-H / CHIRALCEL® OD-3
CHIRALCEL® OJ-H / CHIRALCEL® OJ-3
CHIRALCEL® OX-H / CHIRALCEL® OX-3
CHIRALCEL® OZ-H / CHIRALCEL® OZ-3

3章 コーティング型キラルカラム(逆相用)編

CHIRALPAK® AD-RH / CHIRALPAK® AD-3R
CHIRALPAK® AS-RH / CHIRALPAK® AS-3R
CHIRALPAK® AY-RH / CHIRALPAK® AY-3R
CHIRALPAK® AZ-RH / CHIRALPAK® AZ-3R
CHIRALCEL® OD-RH / CHIRALCEL® OD-3R
CHIRALCEL® OJ-RH / CHIRALCEL® OJ-3R
CHIRALCEL® OX-RH / CHIRALCEL® OX-3R
CHIRALCEL® OZ-RH / CHIRALCEL® OZ-3R

4章 多糖系キラルカラムのトラブルシューティング編

5章 クラウンエーテル型キラルカラム編

CROWNPAK® CR-I(+) / CROWNPAK® CR-I(-)
CROWNPAK® CR(+) / CROWNPAK® CR(-)

6章 両性イオン交換型キラルカラム編

CHIRALPAK® ZWIX(+) / CHIRALPAK® ZWIX(-)

7章 タンパク質化学結合型キラルカラム編

CHIRALPAK® AGP
CHIRALPAK® CBH
CHIRALPAK® HSA

1 章 耐溶剤型キラルカラム (I シリーズ) 編

CHIRALPAK® IA / CHIRALPAK® IA-3

CHIRALPAK® IB / CHIRALPAK® IB-3

CHIRALPAK® IC / CHIRALPAK® IC-3

CHIRALPAK® ID / CHIRALPAK® ID-3

CHIRALPAK® IE / CHIRALPAK® IE-3

CHIRALPAK® IF / CHIRALPAK® IF-3

耐溶剤型キラルカラムは、様々な光学異性体を分離できる適用範囲の広いカラムです。

キラルセクターである多糖誘導体を基材のシリカゲルに固定化しているので、移動相や試料溶解溶媒としてヘキサン、アルコールだけでなく、酢酸エチル、テトラヒドロフラン、ハロゲン系溶媒、ジメチルスルホキシドなどシリカゲルベースの HPLC 用カラムに使用できる全ての溶媒をご使用頂けます。

また、逆相条件でもご使用頂けます。

1 章 耐溶剤型キラルカラム (I シリーズ) 編

1.1	はじめに	3
1.1.1	カラムの仕様	3
1.1.2	カラム使用条件	3
1.1.3	使用可能溶媒	4
1.1.4	カラム保護パーツ	4
1.1.5	サンプルの前処理	4
1.1.6	装置の洗浄	4
1.1.7	注意事項	4
1.2	移動相の選択	5
1.2.1	分析条件決定までの流れ	5
1.2.2	添加剤の選択	6
1.2.3	溶媒の選択	8
1.3	保持時間の調整	10
1.3.1	移動相の組成	10
1.3.2	カラム温度	10
1.3.3	溶媒の種類	11
1.4	検出器について	12
1.5	カラム使用後のケア	13
1.5.1	カラム洗浄条件とリセット条件	13
1.5.2	カラム保存条件	13
1.6	逆相条件での使用について	14
1.6.1	推奨移動相	14
1.6.2	移動相調製方法 (例)	15
1.7	クロマト集	16
1.7.1	カラムの耐久性	16
1.7.2	有機溶媒 100% 移動相	16
1.7.3	IA カラムで一つの化合物を複数の移動相で分析	17
1.7.4	IB カラムで一つの化合物を複数の移動相で分析	17
1.7.5	短時間分析	18
1.7.6	耐溶剤型シリーズ逆相条件 (有機溶媒変更による影響)	18
1.7.7	耐溶剤型キラルカラム逆相条件での移動相の選択	19
1.7.8	耐溶剤型キラルカラム逆相条件でのカラムスクリーニングの例	19
1.7.9	温度変更による影響 (逆相条件)	19

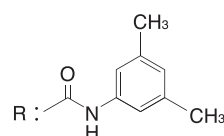
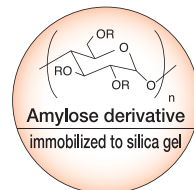
1.1 はじめに

1.1.1 カラムの仕様

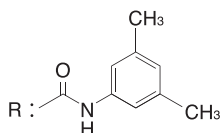
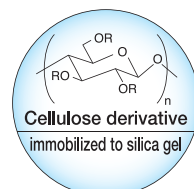
不斉識別剤の構造

CHIRALPAK® IA
CHIRALPAK® IA-3

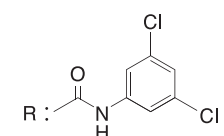
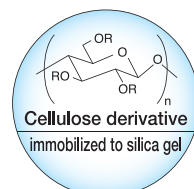
カラムエンド： ウォーターズタイプ
 不斉識別剤： Amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)
 粒径： IA 5 μ m、IA-3 3 μ m
 出荷時の封入溶媒： IA (n-ヘキサン/エタノール = 90/10 (v/v))
 IA-3 (n-ヘキサン/2-プロパノール = 90/10 (v/v))

**CHIRALPAK® IB**
CHIRALPAK® IB-3

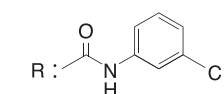
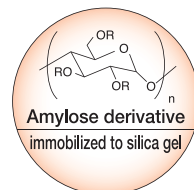
カラムエンド： ウォーターズタイプ
 不斉識別剤： Cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)
 粒径： IB 5 μ m、IB-3 3 μ m
 出荷時の封入溶媒： IB (n-ヘキサン/2-プロパノール = 95/5 (v/v))
 IB-3 (n-ヘキサン/2-プロパノール = 90/10 (v/v))

**CHIRALPAK® IC**
CHIRALPAK® IC-3

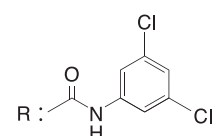
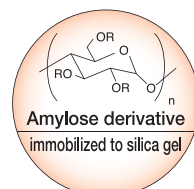
カラムエンド： ウォーターズタイプ
 不斉識別剤： Cellulose tris(3,5-dichlorophenylcarbamate)
 粒径： IC 5 μ m、IC-3 3 μ m
 出荷時の封入溶媒： IC/IC-3 (n-ヘキサン/2-プロパノール = 90/10 (v/v))

**CHIRALPAK® ID**
CHIRALPAK® ID-3

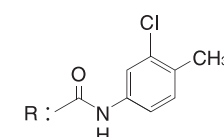
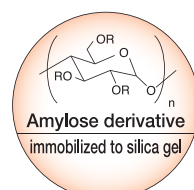
カラムエンド： ウォーターズタイプ
 不斉識別剤： Amylose tris(3-chlorophenylcarbamate)
 粒径： ID 5 μ m、ID-3 3 μ m
 出荷時の封入溶媒： ID/ID-3 (n-ヘキサン/2-プロパノール = 90/10 (v/v))

**CHIRALPAK® IE**
CHIRALPAK® IE-3

カラムエンド： ウォーターズタイプ
 不斉識別剤： Amylose tris(3,5-dichlorophenylcarbamate)
 粒径： IE 5 μ m、IE-3 3 μ m
 出荷時の封入溶媒： IE/IE-3 (n-ヘキサン/2-プロパノール = 90/10 (v/v))

**CHIRALPAK® IF**
CHIRALPAK® IF-3

カラムエンド： ウォーターズタイプ
 不斉識別剤： Amylose tris(3-Chloro-4-methylphenylcarbamate)
 粒径： IF 5 μ m、IF-3 3 μ m
 出荷時の封入溶媒： IF/IF-3 (n-ヘキサン/2-プロパノール = 90/10 (v/v))



1.1.2 カラム使用条件

耐溶剤型キラルカラム (CHIRALPAK® IA/IA-3、IB/IB-3、IC/IC-3、ID/ID-3、IE/IE-3、IF/IF-3) は以下の条件にてご使用下さい。

【表-1：カラム使用条件】

カラム	2.1(2.0)mm 径カラム	4.6mm 径カラム
通液方向	カラムのタグに明示されています。	
圧力	カラムを長くお使い頂くため、30MPa(305kgf/cm ²)を超えない圧力での使用をお奨めします。	
流速の目安	0.1 ~ 0.2mL/min	0.5 ~ 1.0mL/min
温度範囲	0 ~ 40°C(順相系移動相)、5 ~ 40°C(pH7以下の逆相系移動相)、5 ~ 25°C(pH7以上の逆相系移動相)	

※圧力とは、カラム自体にかかる背圧の最大値のことです。この背圧は、カラムをHPLC装置に接続し、通液した場合の系内全体の圧力から、同条件でカラムを接続しない場合の系内全体の圧力を差し引いた値になります。

1.1.3 使用可能溶媒

耐溶剤型キラルカラムは、移動相やサンプル溶解液に様々な有機溶媒を使用することができます。

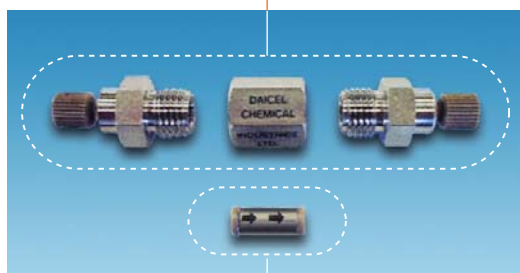
- n-ヘキサン、ヘプタン等のアルカン類
- メタノール、エタノール、2-プロパノール等のアルコール類
- メチル-tert-ブチルエーテル (MTBE)
- 塩化メチレン
- テトラヒドロフラン
- 酢酸エチル
- クロロホルム
- アセトニトリル
- アセトン
- 1,4-ジオキサン
- トルエン
- その他、シリカゲルベースの HPLC カラムに使用可能な溶媒

1.1.4 カラム保護パーツ

カラムを長くお使い頂くために、ガードカートリッジの使用をお奨めいたします。

また、逆相条件で pH7.0 以上でご使用になる際には、必ずご使用下さい。

ガードカートリッジ用ホルダー



ガードカートリッジを使用するためには、ガードカートリッジホルダーが必要です。ガードカートリッジホルダーにガードカートリッジをセットし、短い配管を用いて本カラムの前に接続してください。

ガードカートリッジ

1.1.5 サンプルの前処理

カラムの目詰まりによる圧力の上昇を防ぎ、カラムをより長くお使い頂くために、サンプル及び移動相を使用する前に、0.5 μ m 程度のメンブレンフィルターにて濾過して下さい。

1.1.6 装置の洗浄

- 1) 塩の含まれた水溶液を移動相に使用した装置の場合
→ 塩などを洗い流すために、「蒸留水またはイオン交換水」で充分洗浄した後、エタノールで装置系内を洗浄し、その後、移動相に置換して下さい。
- 2) 順相系の移動相で使用した装置の場合
→ エタノールで装置系内を洗浄した後、移動相に置換して下さい。

1.1.7 注意事項

- カラムに強い衝撃を与えたり、カラムを分解しないで下さい。
- カラムを長くお使い頂くために、専用のガードカートリッジをご使用下さい。特に、逆相条件で pH7.0 以上でご使用になる際には、必ずご使用下さい。

1.2 移動相の選択

耐溶剤型キラルカラムは、シリカゲルベースの HPLC 用カラムに使用できる移動相であれば、相溶性のある組み合わせの範囲内でどのような溶媒系でも使用可能です。

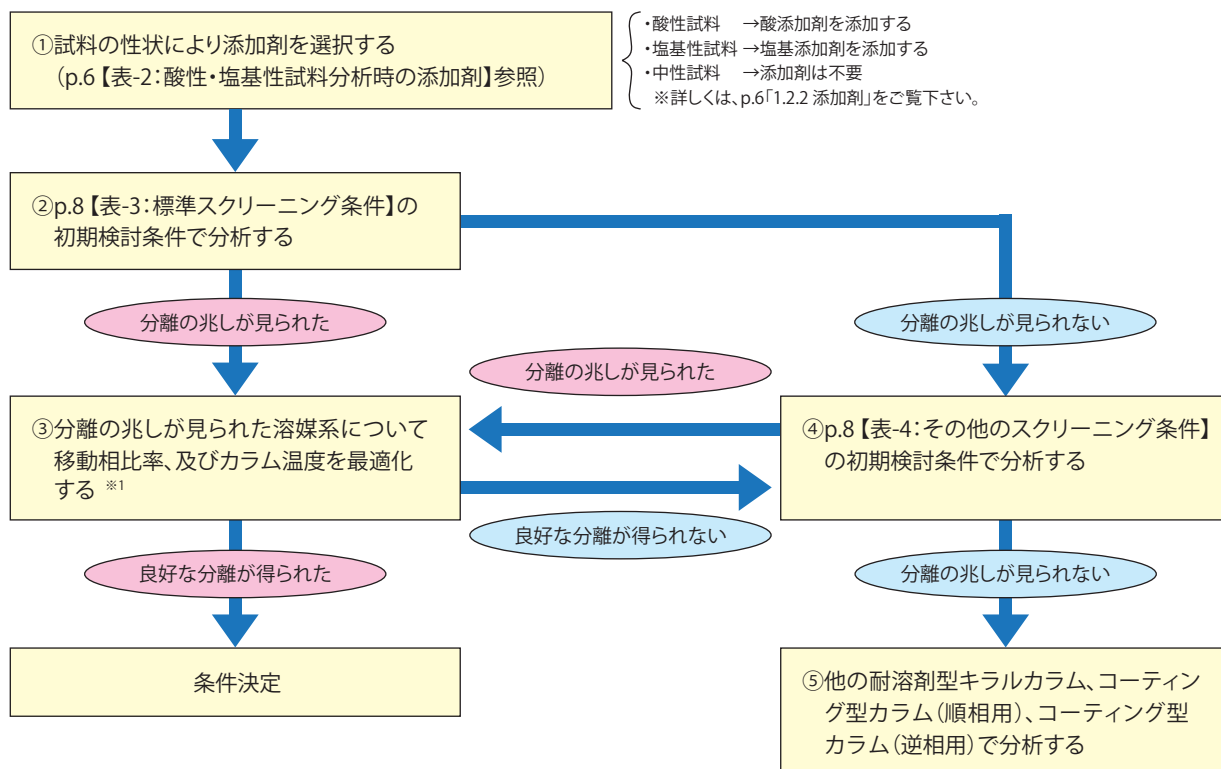
当社で実施した数百種の試料を分析して得られた結果から、最初にスクリーニングする条件として適している移動相条件を p.8【表-3：標準スクリーニング条件】に、その次に適している移動相条件を p.8【表-4：その他のスクリーニング条件】にまとめました。

以下の「1.2.1 分析条件決定までの流れ」、および「移動相選定フローチャート」に従い、移動相をご選定下さい。

1.2.1 分析条件決定までの流れ

- ① 試料の性状に従って、移動相への添加剤の要否を決めます。
p.6「1.2.2 添加剤の選択」をご参照下さい。
- ② p.8【表-3：標準スクリーニング条件】の初期検討条件にて、分析を行います。
- ③ ②の分析で、分離の兆しが見られた場合、
p.8【表-3：標準スクリーニング条件】の推奨移動相範囲を参考にして移動相組成を最適化します。
- ④ ②の分析で分離の兆しが見られない場合には、p.8【表-4：その他のスクリーニング条件】の初期検討条件にて分析を行って下さい。
- ⑤ ④の分析で、分離の兆しが見られた場合、
p.8【表-4：その他のスクリーニング条件】の推奨移動相範囲を参考にして移動相組成を最適化します。
- ⑥ 上記で良好な分離が得られない場合は、他のキラルカラムをお試しください。

移動相選定フローチャート



1.2.2 | 添加剤の選択

酸性試料を分析する際には、トリフルオロ酢酸 (TFA) や酢酸等を、塩基性試料を分析する際にはジエチルアミン (DEA) やモノエタノールアミン (MEA)、エチレンジアミン (EDA) 等を、移動相に 0.1% 程度添加して下さい。

※塩基性が非常に強い試料・移動相または添加剤は、担体であるシリカゲルにダメージを与えることがありますので、ご注意ください。

【表 -2：酸性・塩基性試料分析時の添加剤】

カラム	IA	IB (※2)	IC (※3)	IE	IF	IA	IB	IC	IE	IF
サンプル性状	塩基性化合物					酸性化合物				
スクリーニング時	ジエチルアミン					トリフルオロ酢酸または酢酸				
ピーク形状不良時 (※1)	トリエチルアミン ※3 モノエタノールアミン n-ブチルアミン ※2 エチレンジアミン					—				
添加量	通常 0.1% (最大 0.5%)					通常 0.1% (最大 0.5%)				

※1：塩基性化合物を分析する際、ジエチルアミン (DEA) を添加してもピーク形状が悪い場合に、モノエタノールアミン (MEA) や n-ブタノールアミン (BuA) に変更することにより、ピーク形状が改善することがあります。(p.7 参照)

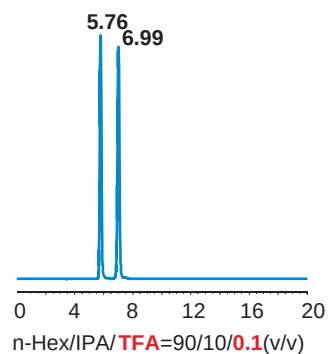
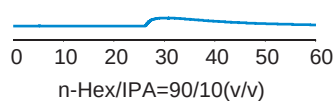
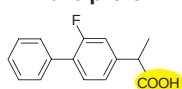
※2：IB の場合、DEA を添加してもピーク形状が悪い場合にエチレンジアミン (EDA) に変更することで、ピーク形状が改善することがあります。(p.7)

※3：IC の場合、DEA を添加してもピーク形状が悪い場合にモノエタノールアミン (MEA) に変更することで、ピーク形状が改善することがあります。(p.7)
モノエタノールアミン (MEA) やエチレンジアミン (EDA) が移動相に相溶しない場合は、2% 程度のアルコール (エタノールまたはメタノール) を添加して下さい。

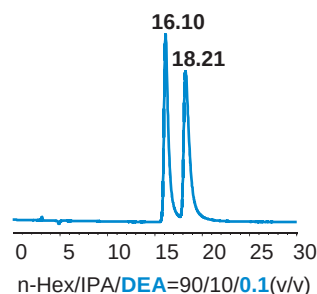
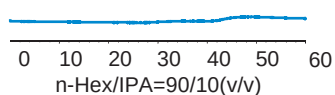
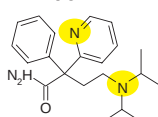
移動相に適切な添加剤を添加することにより、良好な分離が得られます。

Column : CHIRALPAK® IA (内径 4.6mm × 長さ 250mm)
Flow rate : 1.0mL/min.
Temp : 25°C

酸性化合物
Flurbiprofen

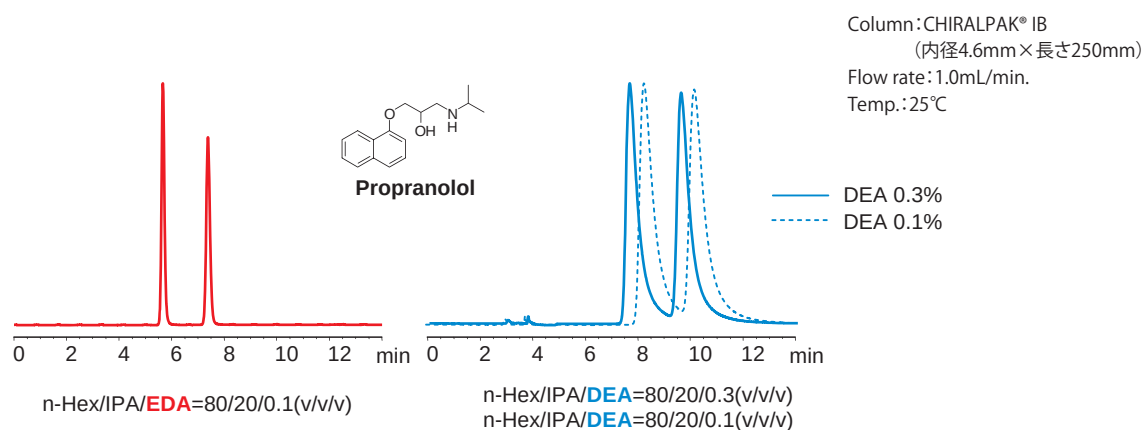


塩基性化合物
Disopyramide



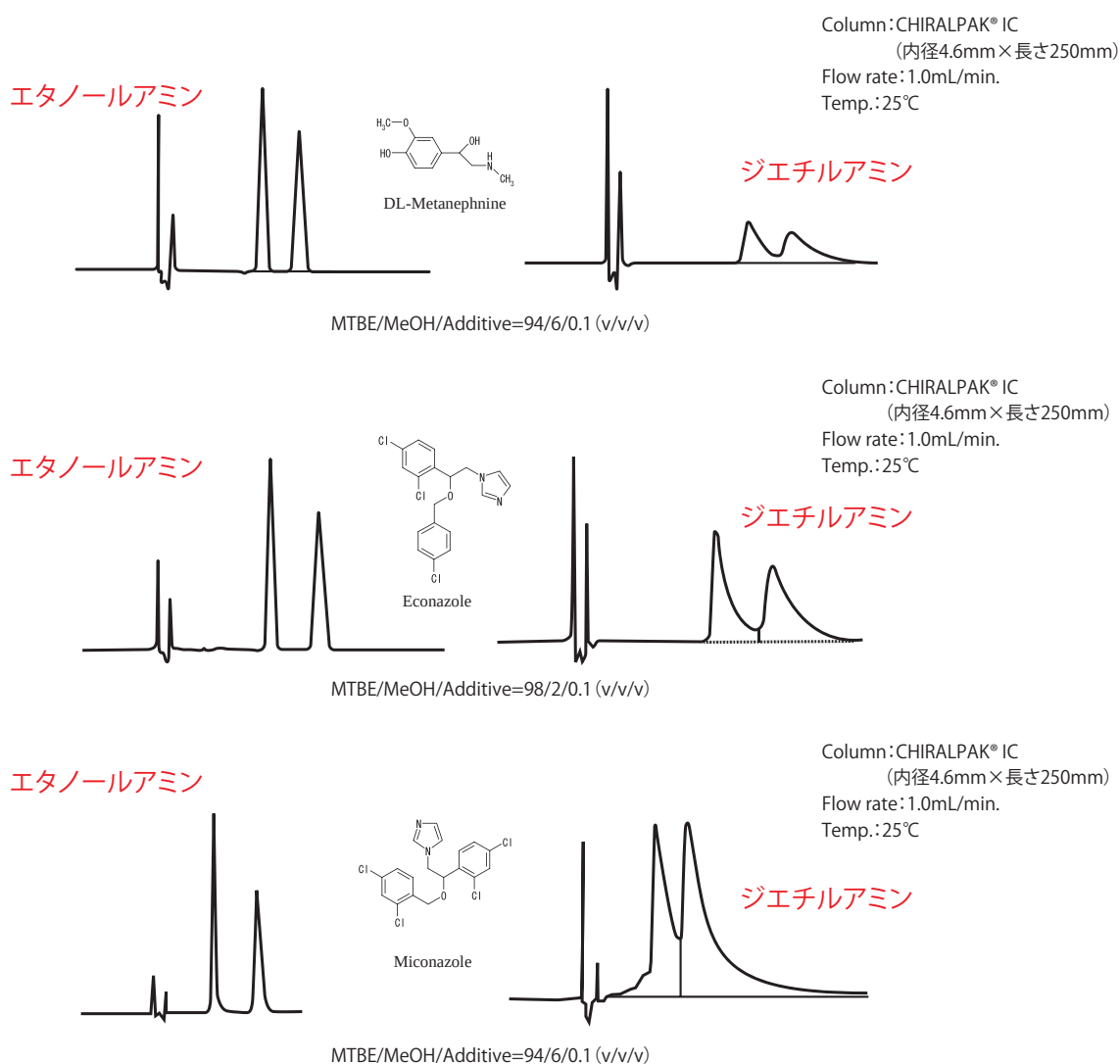
※略語：Hex=ヘキサン、IPA=2-プロパノール、DEA=ジエチルアミン、TFA=トリフルオロ酢酸

IB を使用しての塩基性化合物分析時に、ジエチルアミン (DEA) を添加してもピーク形状が悪い場合、エチレンジアミン (EDA) に変更することで、ピーク形状が改善することがあります。⇒p.6「1.2.2 添加剤の選択」参照



※略語：EDA= エチレンジアミン、DEA= ジエチルアミン、n-Hex= n-ヘキサン、IPA= 2-プロパノール

IC を使用しての塩基性化合物を分析時に、ジエチルアミン (DEA) を添加してもピーク形状が悪い場合、エタノールアミンに変更することで、ピーク形状が改善することがあります。⇒p.6「1.2.2 添加剤の選択」参照



※略語：MTBE = メチル t-ブチルエーテル、MeOH = メタノール

1.2.3 溶媒の選択

酸性試料を分析する際には、トリフルオロ酢酸 (TFA) や酢酸等を、塩基性試料を分析する際にはジエチルアミン (DEA) やモノエタノールアミン (MEA)、エチレンジアミン (EDA) 等を、移動相に 0.1% 程度添加して下さい。

※塩基性が非常に強い試料・移動相または添加剤は、担体であるシリカゲルにダメージを与えることがありますので、ご注意下さい。

【表-3：標準スクリーニング条件】

	1	2	3	4
初期検討条件	n-Hex/IPA =80/20(v/v)	n-Hex/EtOH =80/20(v/v)	MTBE/EtOH =98/2(v/v) ※2	n-Hex/CH ₂ Cl ₂ =50/50(v/v) ※3
推奨移動相範囲	99/1 ~ 50/50(v/v)	99/1 ~ 50/50(v/v)	60/40 ~ 100/0(v/v)	85/15 ~ 0/100(v/v)
流速・温度	通常、n-Hex 比率が大きいほど、保持が強くなります。 1.0mL/min, 25°C (内径×長さ=4.6mm×250mm の場合)			

※1= ハロゲン系溶媒が使用できない場合は、表-4の1 (テトラヒドロフラン系移動相) のご使用をお奨めします。

※2= 試料の溶出が早い場合、エタノールの代わりにヘキサンを用いることで保持を強めることができます。(Max.90% まで)

※3= ピーク形状の不良 (特にテーリングが強い場合)、または保持が強い場合には、エタノール 1 ~ 20% を添加することで改善されることがあります。

【表-4：その他のスクリーニング条件】

	1	2	3	4	5
初期検討条件	n-Hex/THF =70/30	n-Hex/ 酢酸エチル =50/50	n-Hex/CHCl ₃ =30/70	CH ₃ CN/ アルコール類 (or THF) =100/0	メタノール / 別の ※アルコール類 =100/0
推奨移動相範囲	99/1 ~ 50/50 (v/v)	99/1 ~ 50/50 (v/v)	60/40 ~ 100/0 (v/v)	85/15 ~ 0/100 (v/v)	85/15 ~ 0/100 (v/v)
流速・温度	1.0mL/min, 25°C (内径×長さ=4.6mm×250mm の場合)				

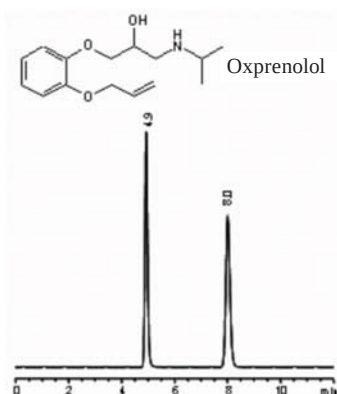
※上記以外に、アセトン、1,4-ジオキサン、トルエン、他、シリカ系カラムに使用可能な溶媒がご使用頂けます。

表中の略語：n-Hex=n-ヘキサン、EtOH=エタノール、MeOH=メタノール、IPA=2-プロパノール、MTBE=メチル-*t*-ブチルエーテル、CH₂Cl₂=ジクロロメタン、THF=テトラヒドロフラン、CHCl₃=クロロホルム、CH₃CN=アセトニトリル

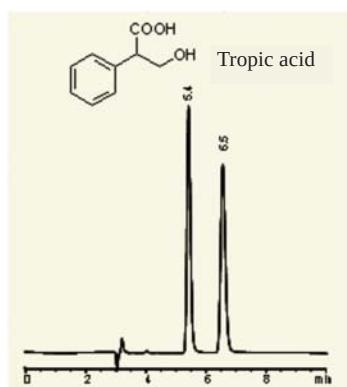
p.8「1.2.3 溶媒の選択」の【表-3：標準スクリーニング条件】で分析した例です。

n-Hex/EtOH=80/20/0.1 (v/v/v) MTBE/EtOH=98/2/0.1 (v/v/v)

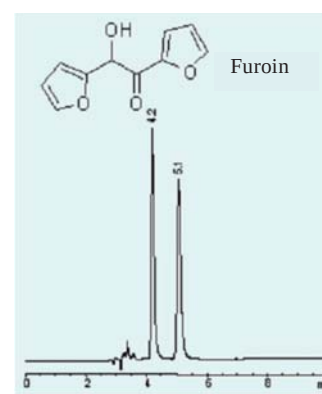
CH₂Cl₂/EtOH=80/20 (v/v)



Column: CHIRALPAK® IB
(内径4.6mm×長さ250mm)
Flow rate: 1.0mL/min.
Temp.: 25°C



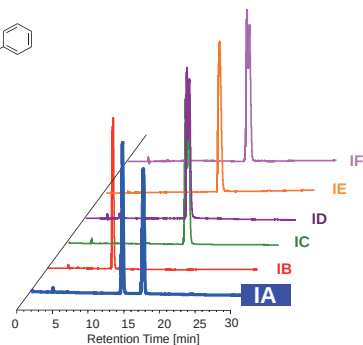
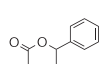
Column: CHIRALPAK® IC
(内径4.6mm×長さ250mm)
Flow rate: 1.0mL/min.
Temp.: 25°C



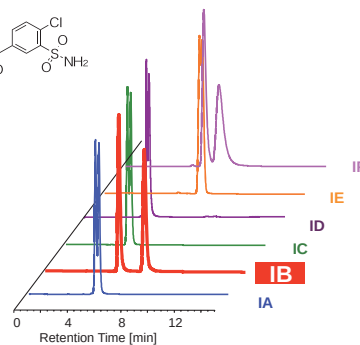
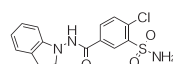
Column: CHIRALPAK® IA
(内径4.6mm×長さ250mm)
Flow rate: 1.0mL/min.
Temp.: 25°C

※略語：n-Hex = n-ヘキサン、EtOH = エタノール、CH₂Cl₂ = ジクロロメタン、MTBE = メチル-*t*-ブチルエーテル

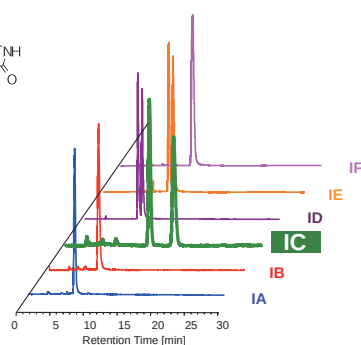
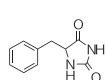
その他のスクリーニング条件の例です。

 γ -Phenyl- γ -butyrolactone

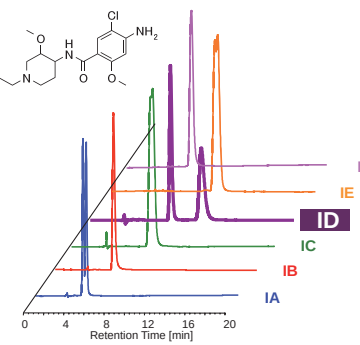
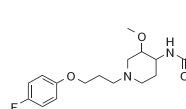
Column size : 4.6mmI.D.×250mmL
 Mobile phase : n-Hex/EtOH=90/10 (v/v)
 Flow rate : 1.0mL/min.
 Temperature : 25°C
 Detection : UV220nm

Indapamide

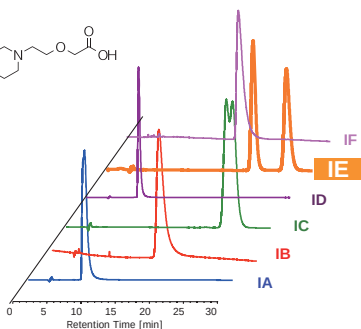
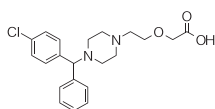
Column size : 4.6mmI.D.×250mmL
 Mobile phase : n-Hex/EtOH/DEA=50/50/0.1 (v/v/v)
 Flow rate : 1.0mL/min.
 Temperature : 25°C
 Detection : UV254nm

5-Benzylhydantoin

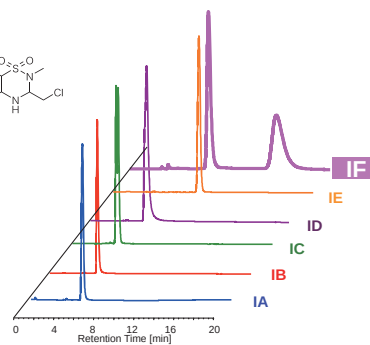
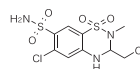
Column size : 4.6mmI.D.×250mmL
 Mobile phase : n-Hex/IPA=80/20 (v/v)
 Flow rate : 1.0mL/min.
 Temperature : 25°C
 Detection : UV220nm

Cisapride

Column size : 4.6mmI.D.×250mmL
 Mobile phase : n-Hex/IPA/DEA=50/50/0.1 (v/v/v)
 Flow rate : 1.0mL/min.
 Temperature : 25°C
 Detection : UV254nm

Cetirizine

Column size : 4.6mmI.D.×250mmL
 Mobile phase : n-Hex/EtOH/AcOH/DEA=50/50/0.1/0.1 (v/v/v/v)
 Flow rate : 1.0mL/min.
 Temperature : 25°C
 Detection : UV230nm

Methyclothiazide

Column size : 4.6mmI.D.×250mmL
 Mobile phase : n-Hex/EtOH/DEA=50/50/0.1 (v/v/v)
 Flow rate : 1.0mL/min.
 Temperature : 25°C
 Detection : UV230nm

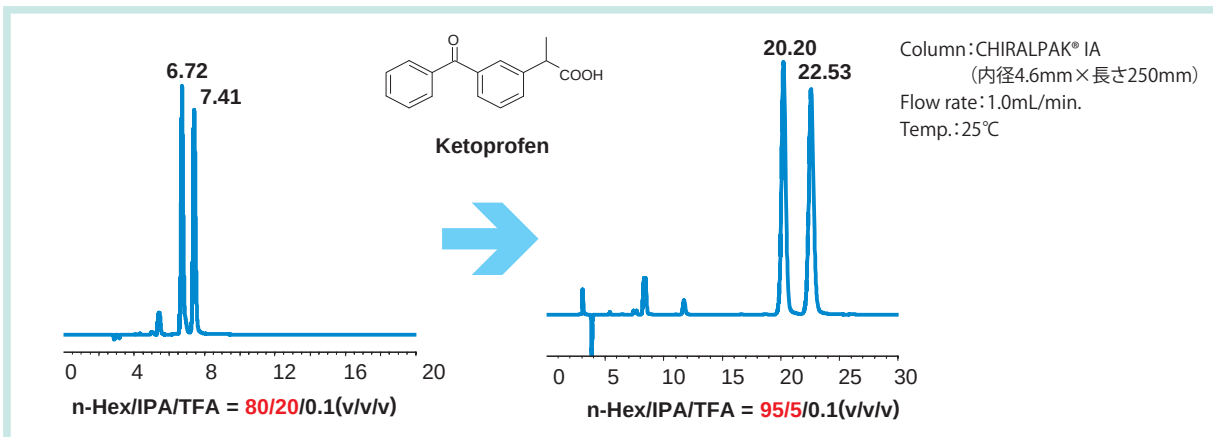
※略語：n-Hex = n-ヘキサン、EtOH = エタノール、DEA = ジエチルアミン、IPA = 2-プロパノール、AcOH = 酢酸

1.3 保持時間の調整

1.3.1 移動相の組成

- 溶出強度の弱い非極性溶媒（アルカン類）の比率が低いほど、保持が弱く、分離も悪くなりますが、十分な分離が得られれば短時間で分析できます。
 - 溶出強度の弱い非極性溶媒（アルカン類）の比率が高いほど、保持が強く、分離も良好になりますが、ピークはブロードになります。従って、目的に応じた有機溶媒比を設定することが重要です。
- ※溶媒別の溶出強度については、p.11【表-5：溶出強度の違い】をご覧ください。

非極性溶媒（アルカン類）の比率が高いほど、保持は弱くなり、ピーク形状はブロードになります。



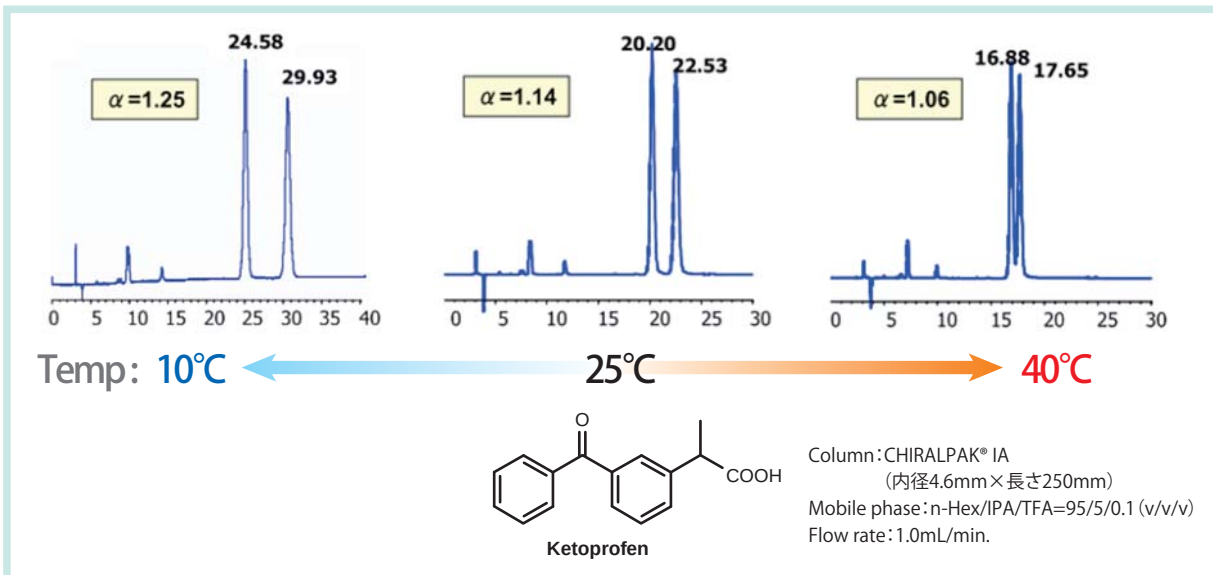
※略語：n-Hex=n-ヘキサン、IPA=2-プロパノール、TFA=トリフルオロ酢酸

1.3.2 カラム温度

カラム温度は順相系移動相をご使用になる場合で 0 ～ 40℃、
pH7 以下の逆相系移動相をご使用になる場合で 5 ～ 40℃、
pH7 以上の逆相系移動相をご使用になる場合で 5 ～ 25℃の範囲でご使用頂けます。

- 低温ほど、保持が強くなり、ピーク形状はブロードになります。
 - 高温ほど、保持が弱くなり、分離も悪くなりますが、十分な分離が得られる場合には短時間で分析できます
- 従って、目的に応じたカラム温度を設定することが重要です。

カラム温度を上げると、保持は弱くなり、ピーク形状はブロードになります。



※略語：n-Hex=n-ヘキサン、IPA=2-プロパノール、TFA=トリフルオロ酢酸

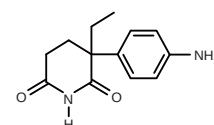
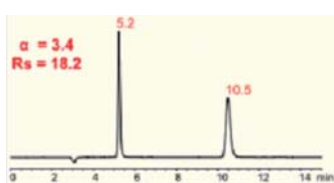
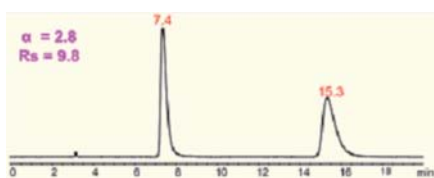
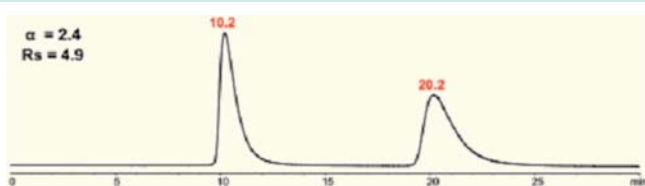
1.3.3 溶媒の種類

- n-ヘキサンのほかには使用できるアルカンとして、iso-ヘキサン、n-ヘプタン等がありますが、サンプルによっては、用いるアルカンの種類で多少分離が異なる場合があります。
- アルコール類としては、メタノール、エタノール、2-プロパノールのほか、1-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール等がありますが、サンプルによっては、用いるアルコールの種類で大きく分離が異なる場合があります。
- 使用する溶媒の種類や組成によっては、移動相の粘性が高くなる場合があります。
- ヘキサンにメタノールを5%以上添加する場合、ヘキサン（アルカン類）との相分離を避けるため、メタノールと同量以上のエタノールまたは2-プロパノールと混合して使用することをお奨めします。
- 移動相を変更する際、原則として相溶性のある溶媒同士であれば直接置換できます。
n-ヘキサン ⇄ メタノール、n-ヘキサン ⇄ アセトニトリルのように混ざり合わない溶媒に変更する際は、一旦エタノールに置換した後、目的の溶媒に置換して下さい。
- 溶媒別の溶出強度については、【表-5：溶出強度の違い】をご参照下さい。

【表-5：溶出強度の違い】

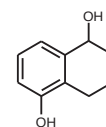
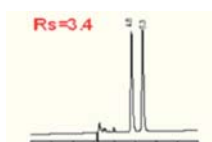
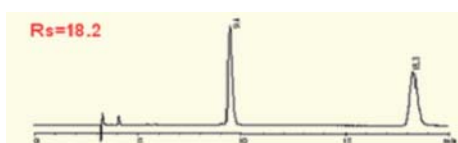
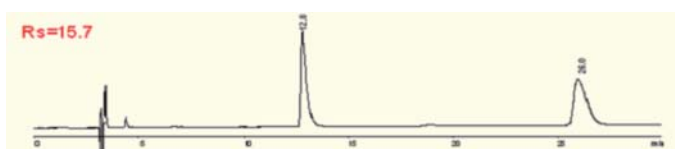
溶媒種類	アセトン > テトラヒドロフラン > アルコール類 > 酢酸エチル > ジクロロメタン > クロロホルム > メチル-tert-ブチルエーテル > n-ヘキサン
溶出強度	強 ←  弱

一般に、溶出力の強さは、アセトン>テトラヒドロフラン>アセトニトリル>アルコール類>酢酸エチル>ジクロロメタン>MTBEの順番になります。



Aminogluthethimide

Column: CHIRALPAK® IA
(内径4.6 mm × 長さ250 mm)
Flow rate: 1.0 mL/min
Temp.: 25°C



1,5-Dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene

Column: CHIRALPAK® IC
(内径4.6 mm × 長さ250 mm)
Flow rate: 1.0 mL/min.
Temp.: 25°C

※略語: CH₃CN = アセトニトリル、EtOAc = 酢酸エチル、n-Hex = n-ヘキサン、MeOH = メタノール

1.4 検出器について

次表のように、移動相の種類やサンプルの構造によっては、UV 検出器による検出が困難になる場合があります。その場合は、検出波長を変更したり、RI 検出器や ELSD（蒸発光散乱検出器）などの UV 吸収に左右されない検出器をご使用下さい

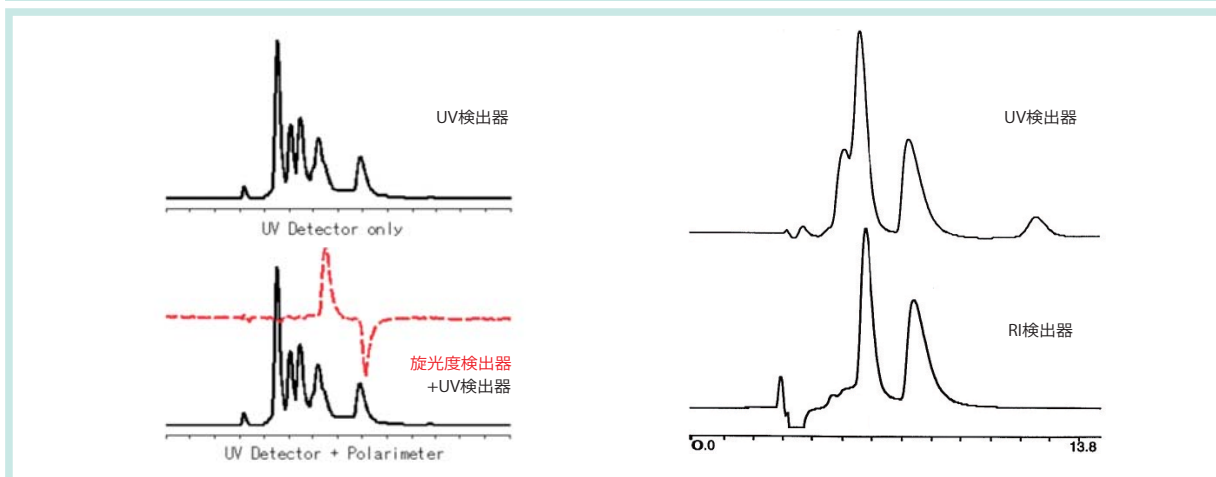
【表 -6：各種溶媒の UV カットオフ波長一覧表】

溶媒	UV カットオフ波長 (nm)	溶媒	UV カットオフ波長 (nm)
THF (※)	212	水	<190
MTBE (※)	210	塩化メチレン	233
1,4- ジオキサン	215	クロロホルム	245
アセトニトリル	190	酢酸エチル	256
ヘキサン	200	DMF (※)	268
ヘプタン	200	DMAc (※)	268
2-プロパノール	205	DMSO (※)	286
エタノール	210	トルエン	284
メタノール	205	アセトン	330

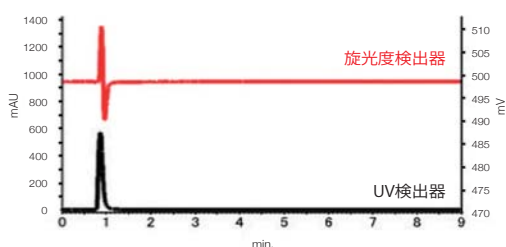
出展：高速液体クロマトグラフィーハンドブック 日本分析科学会関東支部編、(※) アルドリッチカタログ

※表中の略語：THF=テトラヒドロフラン、MTBE=メチル-tert-ブチルエーテル、DMF=N,N-ジメチルホルムアミド、DMAc=N,N-ジメチルアセトアミド、DMSO=ジメチルスルホキシド

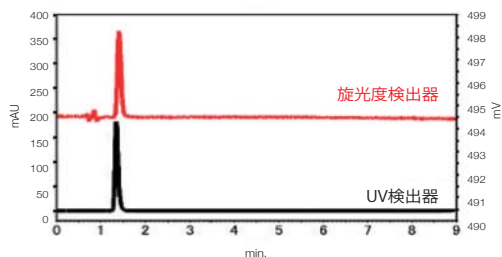
UV 検出器、RI 検出器、旋光度検出器の使用例を示します。



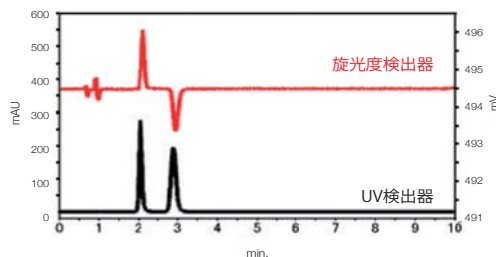
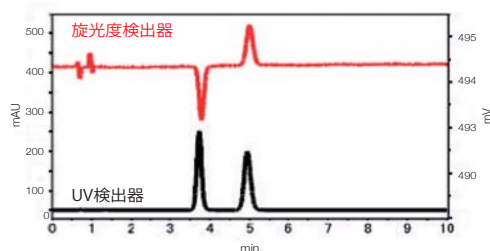
UV検出器では1つのピークに見えるが、旋光度検出器では分離が確認できるケース。



片方のエナンチオマーしか溶出していないケース。



旋光度検出器を使用することで溶出順序が確認できる。



1.5 カラム使用後のケア

1.5.1 カラム洗浄条件とリセット条件

カラムのご使用後は、エタノールで 0.5mL/min×30 分間以上、洗浄して下さい。

また、多糖系キラルカラムの分離特性は、多糖の高次構造に依存します。移動相や温度条件によっては、この高次構造が変化することがあり、そのような条件下で長時間使用されたカラムでは、それ以前の分離が再現できなくなる場合があります。

このような現象が見られた場合は、下記の手順に従ってカラムのリセット操作を行って下さい。

内径 4.6mm カラムの場合

【表-7：リセット条件】

CHIRALPAK®IA CHIRALPAK®ID CHIRALPAK®IE/IE-3 HIRALPAK®IF/IF-3	CHIRALPAK®IA-3 CHIRALPAK®ID-3	CHIRALPAK®IB/IB-3 CHIRALPAK®IC/IC-3
① エタノール 0.5 mL/min. で 30 分通液	① エタノール 0.5 mL/min. で 30 分通液	① 酢酸エチル 1.0 mL/min. で 30 分通液
② N,N-ジメチルホルムアミド (DMF) 0.3 mL/min. で 180 分通液	② N,N-ジメチルホルムアミド (DMF) 0.4 mL/min. で 240 分通液	② カラムを装置から取り外し、両端にキャップをして 48 時間以上放置
③ エタノール 0.3 mL/min. で 50 分通液	③ エタノール 0.05 mL/min. で 600 分通液	③ ④ へ

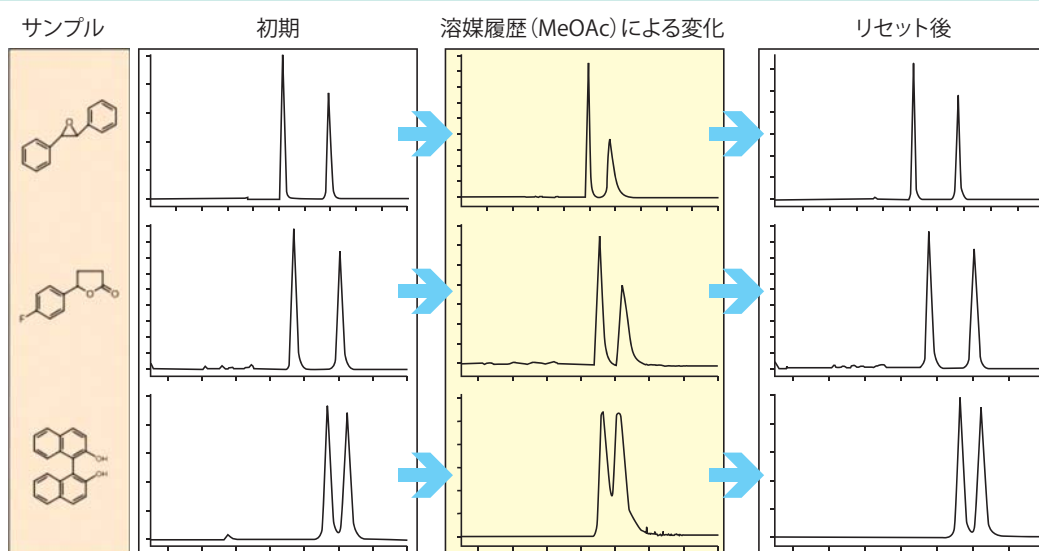
④リセット後は、品質検査レポートと同じ分析条件にてカラムの分離性能をチェックし、出荷時と同等のクロマトグラムが得られるかどうか確認して下さい。

上記の流速・通液時間は 4.6mm 内径のカラムの場合です。細径カラムもしくはセミ分取カラムをご使用の場合は、流速を断面積倍して下さい。5×50cm 分取カラムをご使用の場合は、取扱説明書をご覧ください。

例：IA-3 の 2.1mm 径カラムの場合

① EtOH-0.1mL/min×30min, ② DMF-0.08mL/min×240min, ③ EtOH-0.1mL/min×30min→④へ

IA カラムを例にカラムリセット前後のクロマトグラムを比較しました。



Column : CHIRALPAK® IA
(長さ 250mm× 内径 4.6mm)
Mobile phase : n-Hex/EtOH=90/10(v/v)
Flow rate : 1.0mL/min.
Temp : 25°C

※略語 : CH₃CN = アセトニトリル、n-Hex = n-ヘキサン、EtOH = エタノール

1.5.2 カラム保存条件

- ・カラムを一週間以上ご使用されない場合は、n-ヘキサン/アルコール混合溶媒（例：n-ヘキサン/2-プロパノール=90/10(v/v)）またはエタノールで保存して下さい。
- ・酸性や塩基性の添加剤をご使用された場合は、速やかに添加剤を含まない移動相に置換して下さい。

1.6 逆相条件での使用について

耐溶剤型キラルカラムは、逆相条件でも使用できます。

逆相条件でご使用になる前に、*n*-ヘキサン、水、アセトニトリルなどと相溶性がある溶媒（エタノール）でカラムを十分に置換して下さい。

※ただし、一度逆相条件でご使用したカラムを順相条件でご使用になることはお控え下さい。

カラムの寿命が縮まることや、分離特性が変化する場合があります。

1.6.1 推奨移動相

コーティング型キラルカラム（逆相系）の章（p.32）に記載している有機溶媒（アセトニトリル、メタノール、エタノール、2-プロパノール）に加え、耐溶剤型キラルカラムの移動相には、テトラヒドロフラン、アセトンなどの水溶性有機溶媒も使用できます。

【表-8：標準的な移動相（LC-MS 対応）】

	酸性化合物	中性化合物	塩基性化合物 ^①
水溶液 ^①	ギ酸水溶液 pH2.0	水	DEA で pH9.0 に調整した 20mM 炭酸水素アンモニウム水溶液
有機溶媒 ^②	アセトニトリル、メタノール、エタノール、2-プロパノール、 テトラヒドロフラン、アセトン		
標準的な移動相 組成 ^③	水溶液 / 有機溶媒		

※表中の略語：DEA= ジエチルアミン

- ① 上記移動相で十分な分離が得られない場合は下記の水溶液をお試し下さい。
水溶液の調製は、次頁記載の「移動相調製方法（例）」をご参照下さい。

【表-9：標準的な移動相（LC-MS 対応）で分離しなかった場合に用いる水溶液】

	酸性化合物	塩基性化合物
アミロース系カラム (CHIRALPAK® IA/IA-3, ID/ID-3 IE/IE-3, IF/IF-3)	50mM リン酸緩衝液 pH2.0	20mM ホウ酸緩衝液 pH9.0
	リン酸水溶液 pH2.0	
セルロース系カラム (CHIRALPAK® IB/IB-3, IC/IC-3)	50mM リン酸水溶液 pH2.0	100mM KPF ₆ （または NaPF ₆ ） 水溶液
	リン酸水溶液 pH2.0	リン酸で pH2.0 に調整した 100mM KPF ₆ （または NaPF ₆ ） 水溶液
	リン酸で pH2.0 に調整した 100mM KPF ₆ （または NaPF ₆ ） 水溶液	

- ② ・一般に、有機溶媒の溶出力の強さは、アセトニトリル、エタノール、メタノールの順です。
・有機溶媒としてアルコールを使用した場合、アセトニトリルに比べて背圧が高くなりますのでご注意ください。

- ③
- ・移動相は、ご使用する前に $0.5\mu\text{m}$ 程度の多孔質メンブレンフィルターで濾過して下さい。
 - ・移動相は、水溶液とアセトニトリルの混合液（水 / アセトニトリル = 60/40 (v/v)）から検討を始めることをお勧めします。
試料の溶出時間を調節したい場合は、移動相の組成比を調整して下さい。
（詳細は p10「1.3.1 移動相の組成」をご覧ください。）
 - ・カラムの温度を下げると、保持時間が長くなり分離係数が向上する場合があります。
（詳細は p10「1.3.2 カラム温度」をご覧ください。）
 - ・カラムの温度を上げて流速を下げると、分離度が向上する場合があります。
 - ・有機溶媒は下表の範囲でご使用頂けますが、移動相の有機溶媒組成比が高くなると塩が析出しカラムの詰りの原因になります。

水溶液 / 有機溶媒
90/10 ~ 0/100

- ④
- ・シリカゲルの劣化を避けるため、強塩基性水溶液 ($\text{pH}9.0$) は使用しないで下さい。
 - ・ $\text{pH}7.0$ 以上でご使用になる時は、別売のガードカートリッジをご使用下さい。
また、カラム温度は 25°C 以下にして下さい。
 - ・強塩基性の試料は、シリカゲルを劣化させる恐れがあります。

1.6.2 移動相調製方法（例）

■ ギ酸水溶液 ($\text{pH}2.0$) の調製方法

水 (HPLC グレード) にギ酸を添加し $\text{pH}2.0$ に調整する。

■ リン酸水溶液 ($\text{pH}2.0$) の調製方法

水 (HPLC グレード) にリン酸を添加し $\text{pH}2.0$ に調整する。

■ リン酸緩衝液 ($\text{pH}2.0$) の調整方法

A 液： 50mM リン酸二水素カリウム水溶液
3.40g KH_2PO_4 / FW 136.09 を水 (HPLC グレード) に溶解させ、500mL の水溶液にする。
B 液： リン酸 (85wt% の H_3PO_4)
⇒ A 液に B 液を添加し、 pH を 2.0 に調整する。

■ 20mM 炭酸水素アンモニウム水溶液 ($\text{pH}9.0$) の調製方法

A 液： 20mM 炭酸水素アンモニウム水溶液
0.79g NH_4HCO_3 / FW 79.06 を水 (HPLC グレード) で溶解し、500mL の水溶液にする。
⇒ A 液にジエチルアミンを添加し、 pH を 9.0 に調整する。

■ 100mM ヘキサフルオロリン酸カリウム水溶液および ジエチルアミンで $\text{pH}2.0$ に調整した 100mM ヘキサフルオロリン酸カリウム水溶液の調製方法

A 液： 100mM ヘキサフルオロリン酸カリウム水溶液
⇒ 9.20g KPF_6 / FW 184.07 を水 (HPLC グレード) に溶解し、500mL の水溶液にする。
B 液： リン酸 (85wt% の H_3PO_4)
⇒ A 液に B 液を添加し、 pH を 2.0 に調整する。

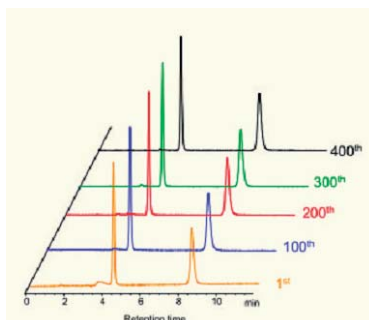
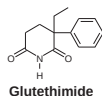
■ 20mM ホウ酸緩衝液 ($\text{pH}9.0$) の調整方法

A 液： 20mM ホウ酸水溶液
1.24g H_3BO_3 / FW 61.83 を水 (HPLC グレード) に溶解し、1L の水溶液にする。
B 液： 20mM 四ホウ酸ナトリウム十水和物水溶液
3.81g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ / FW 381.37 を水 (HPLC グレード) に溶解し、500mL の水溶液にする。
⇒ B 液に A 液を添加し、 $\text{pH}9.0$ に調整する。

1.7.1 カラムの耐久性

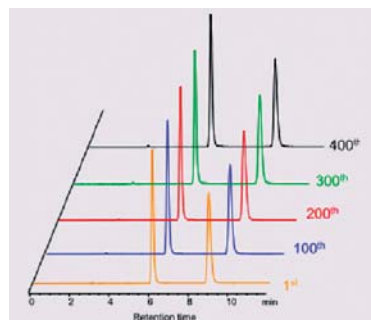
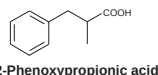
耐溶剤型キラルカラムの耐久性試験を実施しました。
インジェクションを 400 回行った後も、カラムの性能に変化はありません。

酢酸エチル 100%



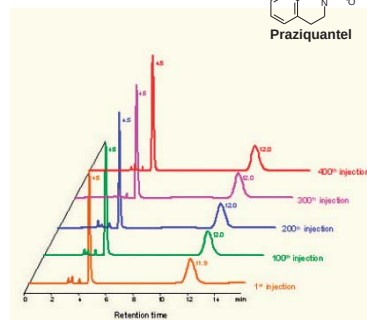
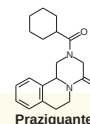
Column: CHIRALPAK® IA
(内径4.6mm×長さ250mm)
Flow rate: 1.0mL/min.
Temp.: 25°C
Detect: UV274nm

クロロホルム/トリフルオロ酢酸
= 100/0.1 (v/v)



Column: CHIRALPAK® IB
(内径4.6mm×長さ250mm)
Flow rate: 1.0mL/min.
Temp.: 25°C
Detect: UV274nm

テトラヒドロフラン 100%

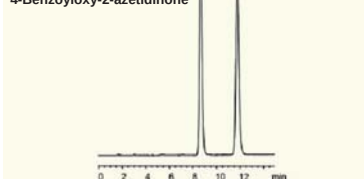
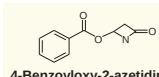


Column: CHIRALPAK® IC
(内径4.6mm×長さ250mm)
Flow rate: 1.0mL/min.
Temp.: 25°C
Detect: ELSD

1.7.2 有機溶媒 100% 移動相

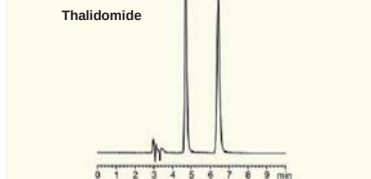
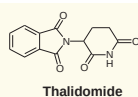
移動相に 100%有機溶媒を使用した場合の分離例を示します。

Mobile phase: ジクロロメタン 100%



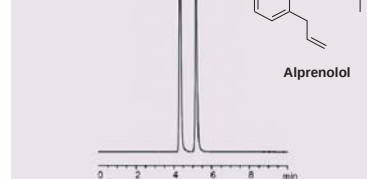
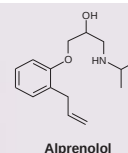
Column: CHIRALPAK® IA
(内径4.6mm×長さ250mm)
Flow rate: 1.0mL/min.
Temp.: 25°C

Mobile phase: メチラール 100%



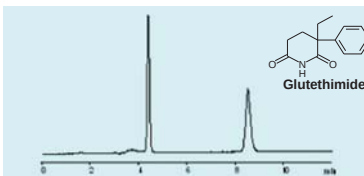
Column: CHIRALPAK® IA
(内径4.6mm×長さ250mm)
Flow rate: 1.0mL/min.
Temp.: 25°C

Mobile phase: MTBE/EDA=100/0.1 (v/v)



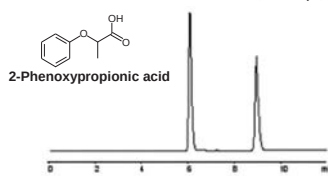
Column: CHIRALPAK® IB
(内径4.6mm×長さ250mm)
Flow rate: 1.0mL/min.
Temp.: 25°C

Mobile phase: 酢酸エチル 100%



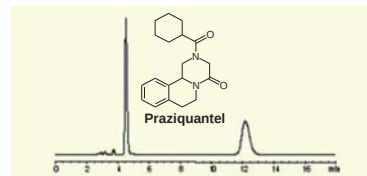
Column: CHIRALPAK® IA
(内径4.6mm×長さ250mm)
Flow rate: 1.0mL/min.
Temp.: 25°C

Mobile phase: クロロホルム/TFA
=100/0.1 (v/v)



Column: CHIRALPAK® IA
(内径4.6mm×長さ250mm)
Flow rate: 1.0mL/min.
Temp.: 25°C

Mobile phase: テトラヒドロフラン 100%



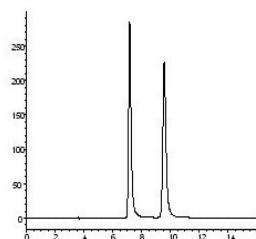
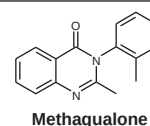
Column: CHIRALPAK® IC
(内径4.6mm×長さ250mm)
Flow rate: 1.0mL/min.
Temp.: 25°C

※略語: MTBE = メチル-tert-ブチルエーテル、EDA = エチレンジアミン、TFA = トリフルオロ酢酸

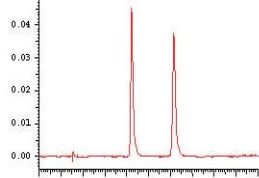
1.7.3 IA カラムで一つの化合物を複数の移動相で分析

IA カラムで Methaqualone を複数の移動相で分析しました。

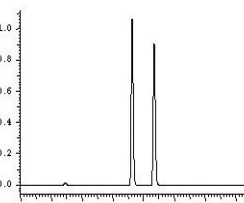
Column: CHIRALPAK® IA
 (内径4.6mm×長さ250mm)
 Flow rate: 1.0mL/min.
 Temp.: 25°C



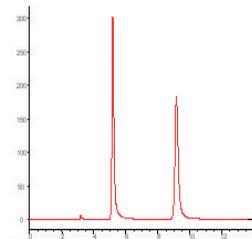
n-Hex/IPA=80/20 (v/v)
 $k_1'=1.45$, $\alpha=2.36$



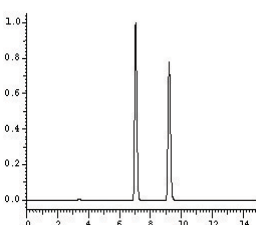
n-Hex/MeOAc=80/20 (v/v)
 $k_1'=1.87$, $\alpha=1.70$



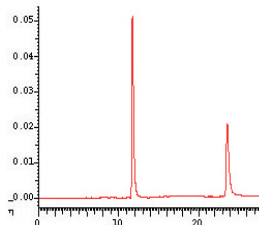
n-Hex/Acetone=85/15 (v/v)
 $k_1'=1.42$, $\alpha=1.33$



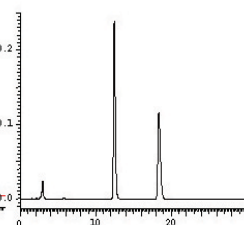
MTBE/EtOH=80/20 (v/v)



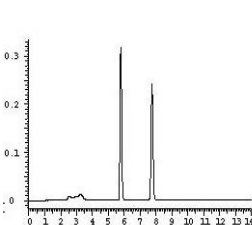
n-Hex/CHCl₃=50/50 (v/v)
 $k_1'=0.64$, $\alpha=1.79$



n-Hex/CH₂Cl₂=75/25 (v/v)
 $k_1'=2.90$, $\alpha=2.36$



n-Hex/THF=85/15 (v/v)
 $k_1'=3.14$, $\alpha=1.63$



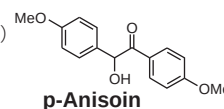
Toluene/n-Hex/THF
 =70/25/5 (v/v/v)
 $k_1'=0.54$, $\alpha=1.96$

※略語：n-Hex=n-ヘキサン、IPA=2-プロパノール、MeOAc=酢酸メチル、Acetone=アセトン、MTBE=メチル-*t*-ブチルエーテル、EtOH=エタノール、CHCl₃=クロロホルム、THF=テトラヒドロフラン

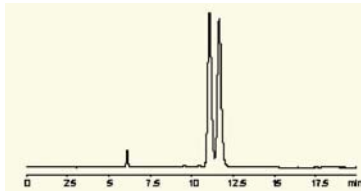
1.7.4 IB カラムで一つの化合物を複数の移動相で分析

IB カラムで p-anisoin を複数の移動相で分析しました。

Column: CHIRALPAK® IB
 (内径4.6mm×長さ250mm)
 Flow rate: 1.0mL/min.
 Temp.: 25°C

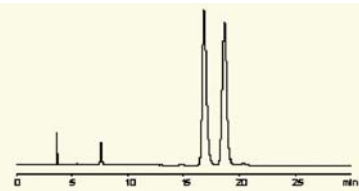


Mobile phase: n-Hex/EtOH = 75/25 (v/v)



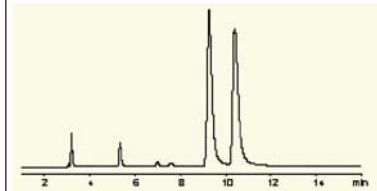
$k_1'=2.65$, $\alpha=1.07$, $R_s=1.47$

Mobile phase: n-Hex/IPA = 70/30 (v/v)

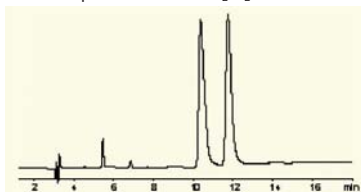


$k_1'=4.54$, $\alpha=1.13$, $R_s=2.60$

Mobile phase: n-Hex/THF = 80/20 (v/v)

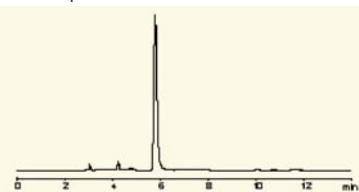


$k_1'=2.02$, $\alpha=1.18$, $R_s=2.75$

Mobile phase: n-Hex/CH₂Cl₂ = 20/80 (v/v)

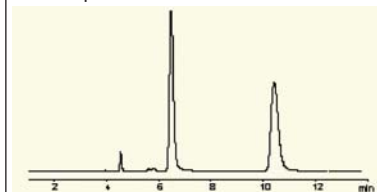
$k_1'=2.39$, $\alpha=1.19$, $R_s=1.47$

Mobile phase: n-Hex/ EtOAc = 60/40 (v/v)



$k_1'=0.89$, $\alpha=1.00$

Mobile phase: MTBE/MeOH = 98/2 (v/v)



$k_1'=1.11$, $\alpha=2.16$, $R_s=10.67$

※略語：n-Hex=n-ヘキサン、EtOH=エタノール、IPA=2-プロパノール、THF=テトラヒドロフラン、CH₂Cl₂=ジクロロメタン、EtOAc=酢酸エチル、MTBE=メチル-*t*-ブチルエーテル、MeOH=メタノール

1.7.5 短時間分析

短時間で良好な分離が得られる場合の例です。

Mobile phase: n-Hex/CH₂Cl₂/DEA =50/50/0.1 (v/v/v) Bupivacain Rs=5.7 Column: CHIRALPAK® IA (内径4.6mm×長さ250mm) Flow rate: 1.0mL/min. Temp.: 25°C	Mobile phase: CH₃CN/EtOAc =70/30 (v/v) Methaqualone Rs=3.2 Column: CHIRALPAK® IA (内径4.6mm×長さ250mm) Flow rate: 1.0mL/min. Temp.: 25°C	
Mobile phase: n-Hex/Toluene/EDA =80/20/0.1 (v/v/v) Oxprenolol Rs=4.0 Column: CHIRALPAK® IB (内径4.6mm×長さ250mm) Flow rate: 1.0mL/min. Temp.: 25°C	Mobile phase: n-Hex/THF =60/40 (v/v) Mephobarbital Rs=6.0 Column: CHIRALPAK® IB (内径4.6mm×長さ250mm) Flow rate: 1.0mL/min. Temp.: 25°C	Mobile phase: n-Hex/THF/MEA =60/40/0.1 (v/v/v) Laudanosine Rs=7.7 Column: CHIRALPAK® IB (内径4.6mm×長さ250mm) Flow rate: 1.0mL/min. Temp.: 25°C

※略語: Hex = ヘキサン, CH₂Cl₂ = ジクロロメタン, DEA = ジエチルアミン, CH₃CN = アセトニトリル, EtOAc = 酢酸エチル, toluene = トルエン, THF = テトラヒドロフラン, MEA = モノエタノールアミン, EDA = エチレンジアミン

1.7.6 耐溶剤型シリーズ逆相条件（有機溶媒変更による影響）

耐溶剤型キラルカラムは逆相条件下でもご使用になれます。
逆相条件下で様々な有機溶媒を用いて分析を行いました。

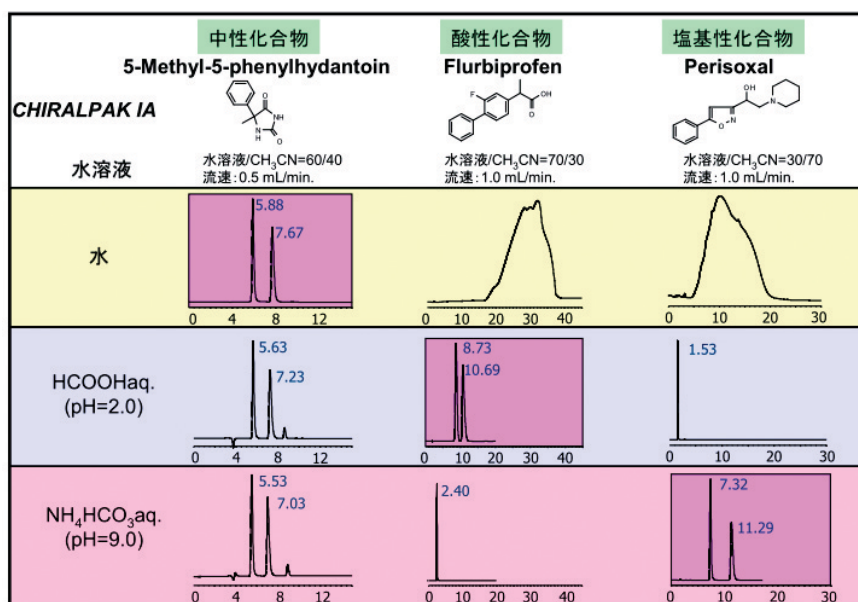
Column: CHIRALPAK® IA
(内径4.6mm×長さ150mm)
Flow rate: 0.5mL/min.
Temp: 25°C

4-Phenyl-2-oxazolidinone	H₂O/THF=80/20 9.70 11.00	H₂O/CH₃CN=70/30 9.88 11.16	H₂O/IPA=65/35 10.48 12.50	H₂O/EtOH=55/45 11.78 12.86	H₂O/MeOH=40/60 9.65 10.35
5-Methyl-5-phenylhydantoin	H₂O/THF=65/35 5.78 6.04	H₂O/CH₃CN=60/40 5.88 7.67	H₂O/IPA=50/50 5.70 6.16	H₂O/EtOH=50/50 6.28 8.90	H₂O/MeOH=40/60 5.73 9.48

※略語: THF = テトラヒドロフラン, CH₃CN = アセトニトリル, IPA = 2-プロパノール, EtOH = エタノール, MeOH = メタノール

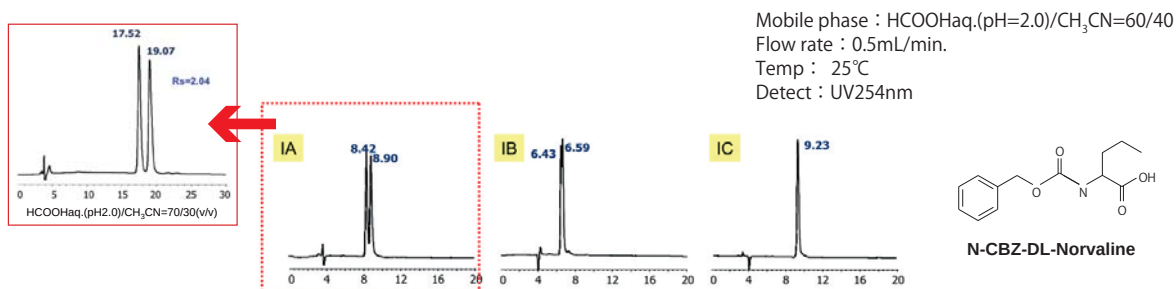
1.7.7 耐溶剤型キラルカラム逆相条件での移動相の選択

短時間で良好な分離が得られる場合の例です。



1.7.8 耐溶剤型シリーズ逆相条件でのカラムスクリーニングの例

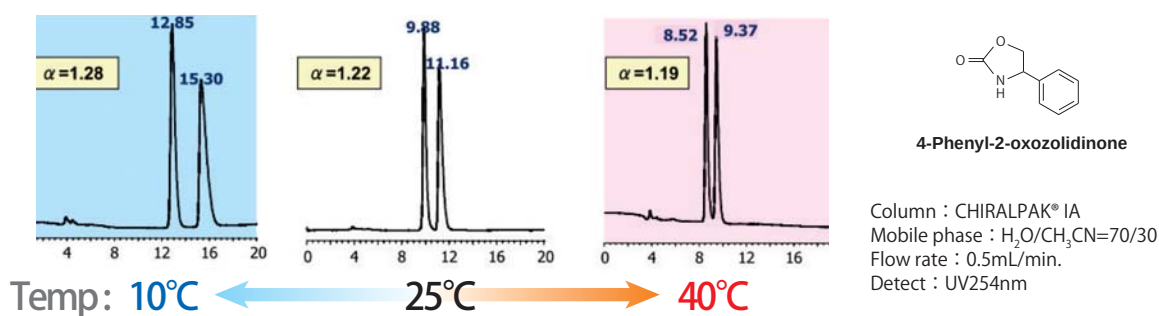
耐溶剤型キラルカラムは逆相条件下でもご使用になれます。
逆相条件下で様々な有機溶媒を用いて分析を行いました。



※略語: CH₃CN = アセトニトリル

1.7.9 温度変更による影響（逆相条件）

短時間で良好な分離が得られる場合の例です。



※略語: CH₃CN = アセトニトリル

2章 コーティング型キラルカラム（順相用）編

CHIRALPAK® AD-H / CHIRALPAK® AD-3
CHIRALPAK® AS-H / CHIRALPAK® AS-3
CHIRALPAK® AY-H / CHIRALPAK® AY-3
CHIRALPAK® AZ-H / CHIRALPAK® AZ-3
CHIRALCEL® OD-H / CHIRALCEL® OD-3
CHIRALCEL® OJ-H / CHIRALCEL® OJ-3
CHIRALCEL® OX-H / CHIRALCEL® OX-3
CHIRALCEL® OZ-H / CHIRALCEL® OZ-3

【特長】

- 多糖誘導体キラルカラムは、適用範囲が広く、キラルカラムを使い分けることで、光学異性体の8割以上が分離可能です。
- セミミクロから分取用まで、幅広いサイズのカラムを取り揃えています。
- 高い理論段数が得られる充填剤粒子径 3 μm のキラルカラムをラインナップしています。

【注意点】

本シリーズのカラムは、多糖誘導体をシリカゲルにコーティングした充填剤を用いています。使用可能溶媒以外を移動相や試料溶解溶媒としてご使用になりますと、カラム性能を損ないます。

【ご使用になれない溶媒】

N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ジオキサン、トルエン、テトラヒドロフラン、クロロホルム、ジクロロメタン、アセトン、酢酸エチル 等。

2章 コーティング型キラルカラム（順相用）編

2.1	はじめに	21
2.1.1	カラムの仕様	21
2.1.2	カラム使用条件	22
2.1.3	使用可能溶媒	22
2.1.4	カラム保護パーツ	22
2.1.5	サンプルの前処理	22
2.1.6	装置の洗浄	22
2.1.7	注意事項	22
2.2	分析条件の決定	23
2.2.1	移動相選定の手順	23
2.2.2	添加剤の選択	24
2.2.3	溶媒の選択	25
2.3	溶媒選択のポイント	25
2.3.1	極性溶媒比率	25
2.3.2	カラム温度	26
2.3.3	溶媒の種類	26
2.4	カラム保存条件	27

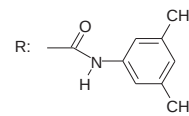
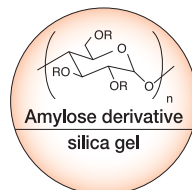
2.1 はじめに

2.1.1 カラムの仕様

不斉識別剤の構造

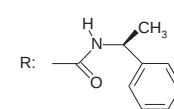
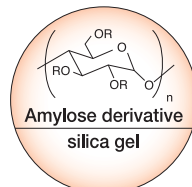
CHIRALPAK® AD-H, CHIRALPAK® AD-3

カラムエンド： ウォーターズタイプ
不斉識別剤： Amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)
粒径： AD-H 5 μ m、AD-3 3 μ m
出荷時の封入溶媒： AD-H (n-ヘキサン/2-プロパノール=90/10(v/v))
AD-3 (n-ヘキサン/2-プロパノール=90/10(v/v))



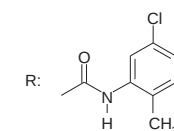
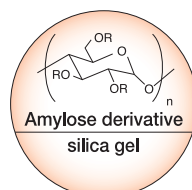
CHIRALPAK® AS-H, CHIRALPAK® AS-3

カラムエンド： ウォーターズタイプ
不斉識別剤： Amylose tris[(S)- α -methylbenzylcarbamate]
粒径： AS-H 5 μ m、AS-3 3 μ m
出荷時の封入溶媒： AS-H (n-ヘキサン/2-プロパノール=90/10(v/v))
AS-3 (n-ヘキサン/2-プロパノール=90/10(v/v))



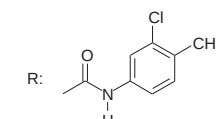
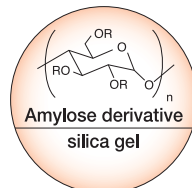
CHIRALPAK® AY-H, CHIRALPAK® AY-3

カラムエンド： ウォーターズタイプ
不斉識別剤： Amylose tris(5-chloro-2-methylphenylcarbamate)
粒径： AY-H 5 μ m、AY-3 3 μ m
出荷時の封入溶媒： AY-H (n-ヘキサン/2-プロパノール=90/10(v/v))
AY-3 (n-ヘキサン/2-プロパノール=90/10(v/v))



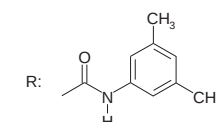
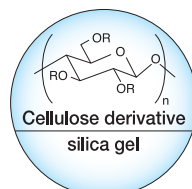
CHIRALPAK® AZ-H, CHIRALPAK® AZ-3

カラムエンド： ウォーターズタイプ
不斉識別剤： Amylose tris(3-chloro-4-methylphenylcarbamate)
粒径： AZ-H 5 μ m、AZ-3 3 μ m
出荷時の封入溶媒： AZ-H (n-ヘキサン/2-プロパノール=90/10(v/v))
AZ-3 (n-ヘキサン/2-プロパノール=90/10(v/v))



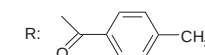
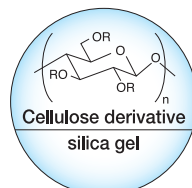
CHIRALCEL® OD-H, CHIRALCEL® OD-3

カラムエンド： ウォーターズタイプ
不斉識別剤： Cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)
粒径： OD-H 5 μ m、OD-3 3 μ m
出荷時の封入溶媒： OD-H (n-ヘキサン/2-プロパノール=90/10(v/v))
OD-3 (n-ヘキサン/2-プロパノール=90/10(v/v))



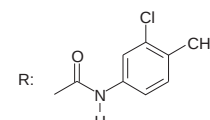
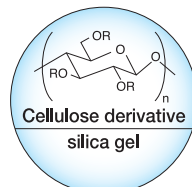
CHIRALCEL® OJ-H, CHIRALCEL® OJ-3

カラムエンド： ウォーターズタイプ
不斉識別剤： Cellulose tris(4-methylbenzoate)
粒径： OJ-H 5 μ m、OJ-3 3 μ m
出荷時の封入溶媒： OJ-H (n-ヘキサン/2-プロパノール=90/10(v/v))
OJ-3 (n-ヘキサン/2-プロパノール=90/10(v/v))



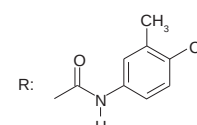
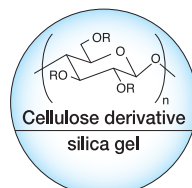
CHIRALCEL® OZ-H, CHIRALCEL® OZ-3

カラムエンド： ウォーターズタイプ
不斉識別剤： Cellulose tris(3-chloro-4-methylphenylcarbamate)
粒径： OZ-H 5 μ m、OZ-3 3 μ m
出荷時の封入溶媒： OZ-H (n-ヘキサン/2-プロパノール=90/10(v/v))
OZ-3 (n-ヘキサン/2-プロパノール=90/10(v/v))



CHIRALCEL® OX-H, CHIRALCEL® OX-3

カラムエンド： ウォーターズタイプ
不斉識別剤： Cellulose tris(4-chloro-3-methylphenylcarbamate)
粒径： OX-H 5 μ m、OX-3 3 μ m
出荷時の封入溶媒： OX-H (n-ヘキサン/2-プロパノール=90/10(v/v))
OX-3 (n-ヘキサン/2-プロパノール=90/10(v/v))



2.1.2 | カラム使用条件

多糖系順相用キラルカラム (CHIRALPAK® AD-H、AD-3、AS-H、AS-3、AY-H、AY-3、AZ-H、AZ-3 及び CHIRALCEL® OD-H、OD-3、OJ-H、OJ-3、OZ-H、OZ-3、OX-H、OX-3) は以下の条件にてご使用下さい。

【表 -10：カラム使用条件】

カラム	2.1(2.0)mm 径カラム	4.6mm 径カラム
通液方向	カラムのタグに明示されています。	
圧力	カラムを長くお使い頂くため、30MPa(305kgf/cm ²) を超えない圧力でのご使用をお奨めします。	
流速の目安	0.1 ~ 0.2mL/min	0.5 ~ 1.0mL/min
温度範囲	0 ~ 40℃	

※圧力とは、カラム自体にかかる背圧の最大値のことです。この背圧は、カラムを HPLC 装置に接続し、通液した場合の系内全体の圧力から、同条件でカラムを接続しない場合の系内全体の圧力を差し引いた値になります。

2.1.3 | 使用可能溶媒

- ・ n- ヘキサン、ヘプタン等のアルカン類
- ・ メタノール、エタノール、2- プロパノール等のアルコール類
- ・ メチル -t- ブチルエーテル (MTBE)

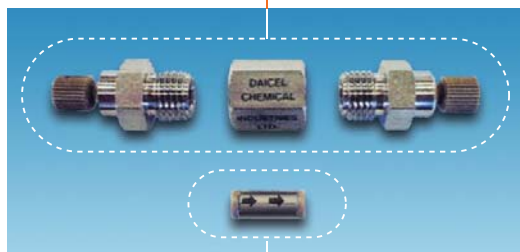
※MTBE は、50vol% 以下の濃度でお使い下さい。

また、CHIRALPAK® AD-H、AD-3、AS-H、AS-3、AY-H、AY-3、AZ-H、AZ-3 及び CHIRALCEL® OD-H、OD-3、OJ-H、OJ-3、OZ-H、OZ-3、OX-H、OX-3 以外のコーティング型キラルカラムではご使用にならないで下さい。

2.1.4 | カラム保護パーツ

カラムを長くお使い頂くために、ガードカートリッジの使用をお奨めいたします。

ガードカートリッジ用ホルダー



ガードカートリッジ

ガードカートリッジを使用するためには、ガードカートリッジホルダーが必要です。ガードカートリッジホルダーにガードカートリッジをセットし、短い配管を用いて本カラムの前に接続してください。

2.1.5 | サンプルの前処理

カラムの目詰まりによる圧力の上昇を防ぎ、カラムをより長くお使い頂くために、サンプル及び移動相を使用する前に、0.5 μm 程度のメンブレンフィルターにて濾過して下さい。

2.1.6 | 装置の洗浄

- 1) 塩の含まれた水溶液を移動相に使用した装置の場合
→ 塩などを洗い流すために、「蒸留水またはイオン交換水」で充分洗浄した後、エタノールで装置系内を洗浄し、その後、移動相に置換して下さい。
- 2) 順相系の移動相で使用した装置の場合
→ エタノールで装置系内を洗浄した後、移動相に置換して下さい。

2.1.7 | 注意事項

- ・ 使用可能溶媒 (p.25「2.2.2 使用可能溶媒」参照) 以外の溶媒を移動相や使用溶解溶媒に使用しないで下さい。
- ・ カラムに強い衝撃を与えたり、カラムを分解しないで下さい。
- ・ カラムを長くお使い頂くために、専用のガードカートリッジをご使用下さい。

2.2 分析条件の決定

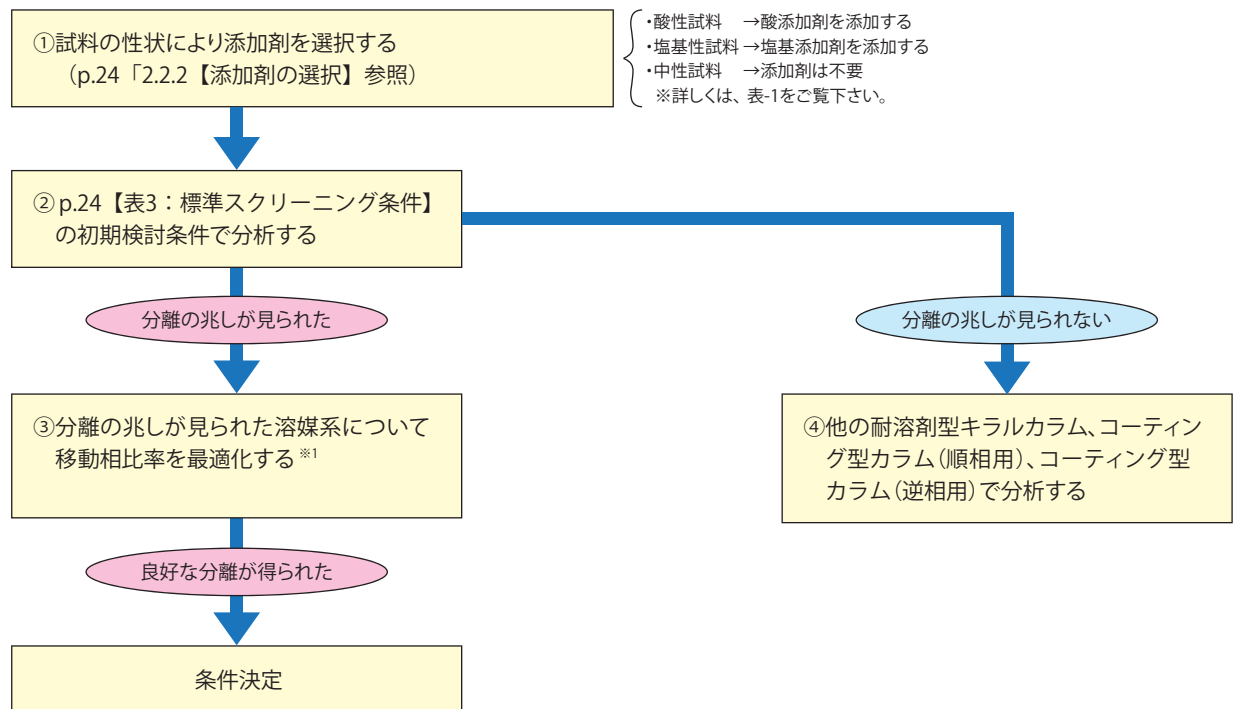
コーティング型キラルカラム（順相用）は、n-ヘキサン、ヘプタン等のアルカン類、メタノール、エタノール、2-プロパノール等のアルコール類、MTBE（メチル-tert-ブチルエーテル）の溶媒を相溶性のある組み合わせの範囲内でご使用になれます。（その以外の溶媒は使用しないで下さい。）

最初にスクリーニングする条件として適している移動相条件を【表-12：標準スクリーニング条件】にまとめました。「2.2.1 溶媒選択手順」、および「溶媒選択フローチャート」に従い、移動相をご選定下さい。

2.2.1 移動相選定の手順

- ① 試料の性状に従って、移動相への添加剤の要否を決めます。
p.24「2.2.2 添加剤の選択」をご参照下さい。
- ② p.24【表-12：標準スクリーニング条件】の初期検討条件にて、分析を行います。
- ③ ②の分析で、分離の兆しが見られた場合、
p.24【表-12：標準スクリーニング条件】の推奨移動相範囲を参考にして移動相組成を最適化します。
- ④ 上記で良好な分離が得られない場合は、他のキラルカラムをお試しください。

移動相選定フローチャート



※1 保持時間の調節につきましては、p.26「2.3.2 カラム温度」をご参考下さい。

2.2.2 | 添加剤の選択

酸性試料を分析する際には、トリフルオロ酢酸 (TFA) や酢酸等を、また同様に塩基性試料を分析する際にはジエチルアミン (DEA) やモノエタノールアミン (MEA)、エチレンジアミン (EDA) 等を、移動相に 0.1% 程度添加して下さい。

※塩基性が非常に強い試料・移動相または添加剤は、担体であるシリカゲルにダメージを与えることがありますので、ご注意下さい。

【表 -11：酸性・塩基性試料分析時の添加剤】

試料の性状	塩基性化合物の場合	酸性化合物の場合
スクリーニング時	ジエチルアミン	トリフルオロ酢酸または酢酸
ピーク形状不良時 ^(※1)	モノエタノールアミン n-ブチルアミン エチレンジアミン	—
添加量	通常 0.1% (最大 0.5%)	通常 0.1% (最大 0.5%)

*1：塩基性化合物を分析する際、ジエチルアミン (DEA) を添加してもピーク形状が悪い場合に、モノエタノールアミン (MEA) や n-ブチルアミンに変更することにより、ピーク形状が改善することがあります。

MEA が移動相に相溶しない場合は、2% 程度のアルコール（エタノールまたはメタノール）を添加して下さい。

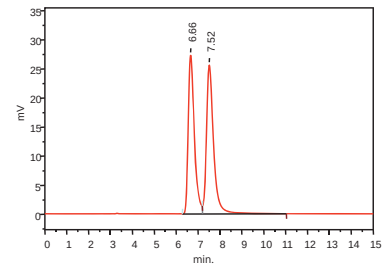
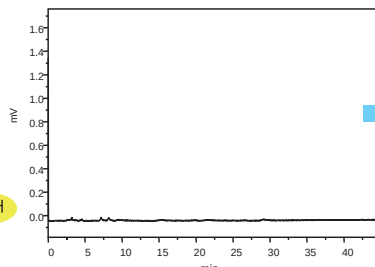
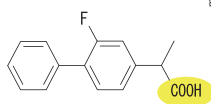
CHIRALPAK® AZ/AZ-3 は、移動相中に塩基性の添加剤を添加することはできません。

移動相に適切な添加剤を添加することにより、良好な分離が得られます。

Column： CHIRALPAK® AD
(内径 4.6mm× 長さ 250mm)
Flow rate： 1.0mL/min.
Temp： 40℃
Detect： UV (254nm)

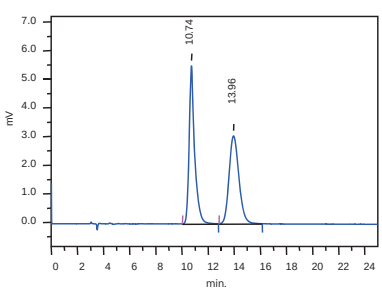
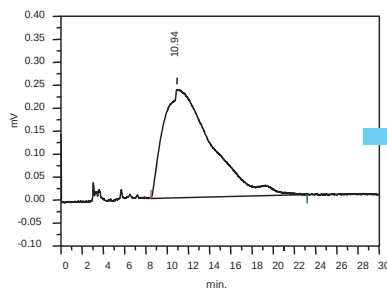
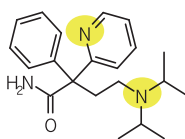
酸性化合物

Flurbiprofen



塩基性化合物

Disopyramide



※略語：n-Hex = n-ヘキサン、IPA = 2-プロパノール、AcOH = 酢酸、DEA = ジエチルアミン

2.2.3 溶媒の選択

酸性試料を分析する際には、トリフルオロ酢酸 (TFA) や酢酸等を、塩基性試料を分析する際にはジエチルアミン (DEA) やモノエタノールアミン (MEA)、エチレンジアミン (EDA) 等を、移動相に 0.1% 程度添加して下さい。

※塩基性が非常に強い試料・移動相または添加剤は、担体であるシリカゲルにダメージを与えることがありますので、ご注意ください。

【表 -12：標準スクリーニング条件】

	1	2	3	4
初期検討条件	n-Hex/IPA =80/20(v/v)	n-Hex/EtOH =80/20(v/v)	CH ₃ CN/ アルコール類 =100/0(v/v)	MeOH/ 別の* アルコール =100/0(v/v)
推奨移動相範囲	99/1 ~ 50/50(v/v)	99/1 ~ 50/50(v/v)	80/20 ~ 100/0(v/v)	0/100 ~ 100/0(v/v) *: EtOH, IPA
	通常、n-Hex 比率が大きいほど、保持が強くなります。			
流速・温度	1.0mL/min., 25°C (内径×長さ=4.6mm×250mm の場合)			

表中の略語：n-Hex=n-ヘキサン、EtOH=エタノール、CH₃CN=アセトニトリル、MeOH=メタノール、IPA=2-プロパノール

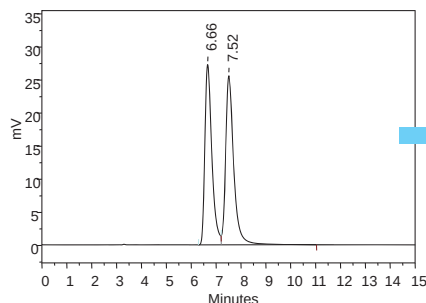
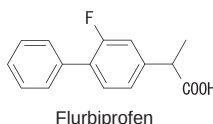
2.3 溶媒選択のポイント

2.3.1 極性溶媒比率

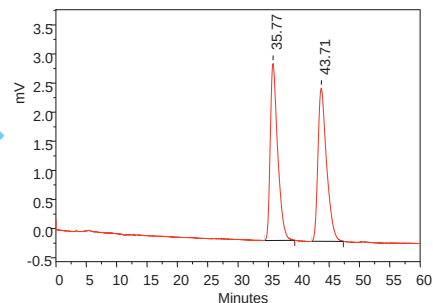
- 溶出強度の弱い非極性溶媒 (アルカン類) の比率が低いほど、保持が弱く、分離も悪くなりますが、十分な分離が得られれば短時間で分析できます。
 - 溶出強度の弱い非極性溶媒 (アルカン類) の比率が高いほど、保持が強く、分離も良好になりますが、ピークはブロードになります。
- 従って、目的に応じた有機溶媒比を設定することが重要です。

極性溶媒 (アルカン類) の比率が低いほど、保持は弱くなり、ピーク形状はブロードになります。

Column : CHIRALPAK® AD
(内径 4.6mm×長さ 250mm)
Temp : 40°C
Flow rate : 1.0mL/min.



n-Hex/IPA/ AcOH = 90/10/0.1(v/v/v)



n-Hex/IPA/ AcOH = 100/1/0.1(v/v/v)

※略語：n-Hex = n-ヘキサン、IPA = 2-プロパノール、AcOH = 酢酸

2.3.2 | カラム温度

カラム温度は 0 ～ 40℃ の範囲でご使用頂けます。

● 低温ほど、保持が強くなり、ピーク形状はブロードになります。

● 高温ほど、保持が弱くなり、分離も悪くなりますが、十分な分離が得られる場合には短時間で分析できます。
従って、目的に応じたカラム温度を設定することが重要です。

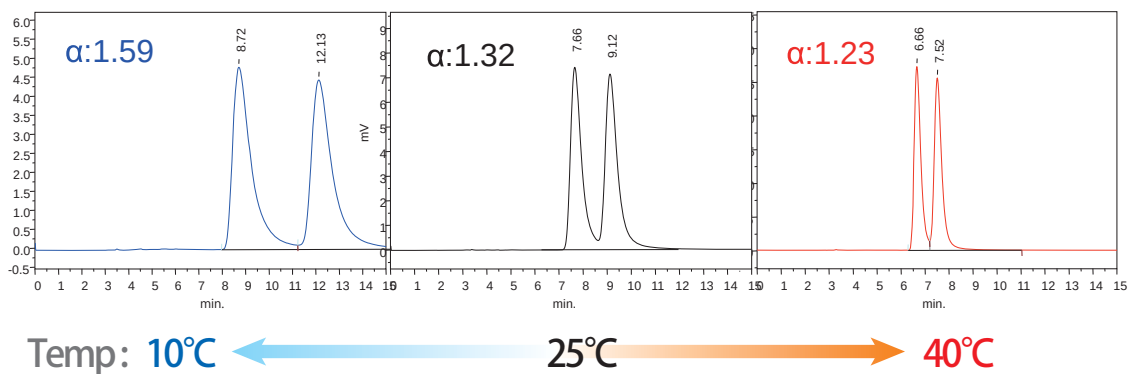
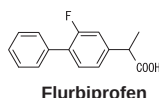
カラム温度を上げると、保持は弱くなり、ピーク形状はシャープになります。

Column : CHIRALPAK® AD

(内径 4.6mm × 長さ 250mm)

Mobile phase : n-Hex/IPA/AcOH=90/10/0.1(v/v/v)

Flow rate : 1.0mL/min.



※略語：n-Hex = n-ヘキサン、IPA = 2-プロパノール、AcOH = 酢酸

2.3.3 | 溶媒の種類

・ n-ヘキサンのほかに使用できるアルカンとして、iso-ヘキサン、n-ヘプタン等があります。

サンプルによっては、用いるアルカンの種類で多少分離が異なる場合があります。

・ アルコール類としては、メタノール、エタノール、2-プロパノールのほか、1-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール等があります。

サンプルによっては、用いるアルコールの種類で大きく分離が異なる場合があります。

・ 使用する溶媒の種類や組成によっては、移動相の粘性が高くなる場合がありますので、カラムの最大使用圧力を超えないよう組成を変更したり、流速を下げるなどの操作を行って下さい。

・ ヘキサンにメタノールを 5% 以上添加する場合、ヘキサン（アルカン類）との二層分離を避けるため、同量以上のエタノールまたは 2-プロパノールと混合して使用することをお勧めします。

・ 移動相を変更する際、原則として相溶する溶媒同士であれば直接置換できます。

ヘキサン⇄メタノール、ヘキサン⇄アセトニトリルのように混ざり合わない溶媒に変更する際は、一旦エタノールに置換した後、目的の溶媒に置換して下さい。

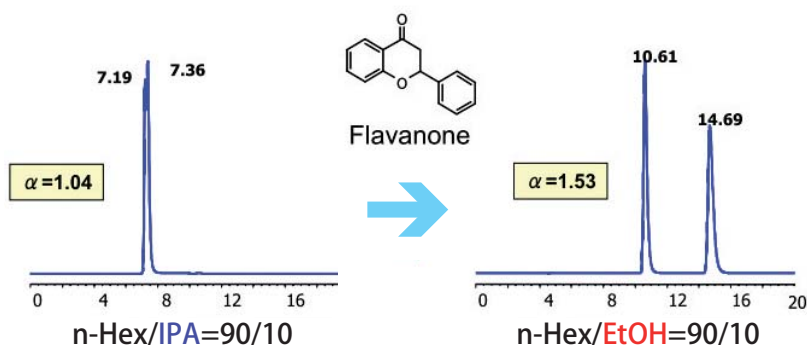
2-プロパノールとエタノールとでは、ピーク形状やα値が異なる場合があります。

Column: CHIRALPAK® AD-H

(内径 4.6mm × 長さ 250mm)

Flow rate: 1.0mL/min.

Temp.: 25°C



※略語：n-Hex = n-ヘキサン、IPA = 2-プロパノール、EtOH = エタノール

2.4 カラム保存条件

- ・ カラムを一週間以上ご使用されない場合は、ヘキサン / アルコール混合溶媒
（例：n- ヘキサン / 2-プロパノール = 90/10 (v/v)）またはエタノールで保存して下さい。
- ・ 酸性や塩基性の添加剤をご使用された場合は、速やかに添加剤を含まない移動相に置換して下さい。

3 章 コーティング型キラルカラム (逆相用) 編

CHIRALPAK® AD-RH / CHIRALPAK® AD-3R
CHIRALPAK® AS-RH / CHIRALPAK® AS-3R
CHIRALPAK® AY-RH / CHIRALPAK® AY-3R
CHIRALPAK® AZ-RH / CHIRALPAK® AZ-3R
CHIRALCEL® OD-RH / CHIRALCEL® OD-3R
CHIRALCEL® OJ-RH / CHIRALCEL® OJ-3R
CHIRALCEL® OX-RH / CHIRALCEL® OX-3R
CHIRALCEL® OZ-RH / CHIRALCEL® OZ-3R

逆相用キラルカラム CHIRALPAK® AD-RH、AS-RH、AY-RH、AZ-RH (AD-3R、AS-3R、AY-3R、AZ-RH) 及び CHIRALCEL® OD-RH、OJ-RH、OZ-RH、OX-RH (OD-3R、OJ-3R、OZ-3R、OX-3R) で分離される化合物は、各々対応する順相系キラルカラム CHIRALPAK® AD-H、AS-H、AY-H、AZ-H (AD-3、AS-3、AY-3、AZ-3) 及び CHIRALCEL® OD-H、OJ-H、OZ-H、OX-3R (OD-3、OJ-3、OZ-3、OX-3R) と非常に類似しておりますが、特に以下の分離に適しています。

1. 水系の溶離液を用いて光学異性体分離を行いたい場合
2. 水溶性試料を光学分割したい場合
3. 試料がイオン性化合物 (例えばアンモニウム塩など) の場合

その他、ODS カラムとの組み合わせによる多成分系の分離など応用性に優れたカラムです。

3 章 コーティング型キラルカラム (逆相用) 編

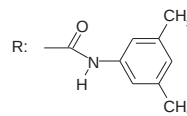
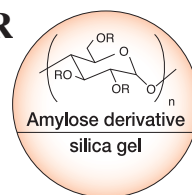
3.1	はじめに	29
3.1.1	カラムの仕様	29
3.1.2	カラム使用条件	30
3.1.3	使用可能溶媒	30
3.1.4	カラム保護パーツ	30
3.1.5	サンプルの前処理	30
3.1.6	装置の洗浄	30
3.1.7	カラムに通液する前に	30
3.1.8	注意事項	30
3.2	移動相の選択	31
3.2.1	移動相選定の手順	31
3.3	推奨移動相条件及び移動相調製方法	32
3.3.1	推奨移動相	32
3.3.2	移動相調製方法 (例)	34
3.4	保持時間の調節	35
3.4.1	有機溶媒比の効果	35
3.4.2	有機溶媒の選択	35
3.4.3	カラム温度の効果	36
3.4.4	移動相の pH 値の影響 (酸性化合物の場合)	36
3.4.5	移動相の pH 値の影響 (塩基性化合物の場合)	37
3.4.6	緩衝液に用いる塩の種類の影響	37

3.1.1 カラムの仕様

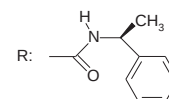
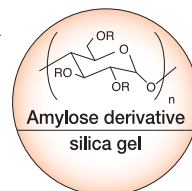
不斉識別剤の構造

CHIRALPAK® AD-RH, CHIRALPAK® AD-3R

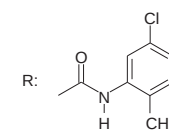
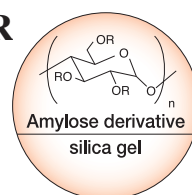
カラムエンド： ウォーターズタイプ
 不斉識別剤： Amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)
 粒径： AD-RH 5 μ m、AD-3R 3 μ m
 出荷時の封入溶媒： AD-RH (水 / アセトニトリル = 60/40(v/v))
 AD-3R (水 / アセトニトリル = 60/40(v/v))

**CHIRALPAK® AS-RH, CHIRALPAK® AS-3R**

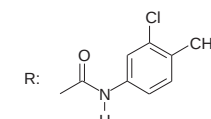
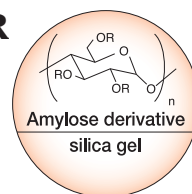
カラムエンド： ウォーターズタイプ
 不斉識別剤： Amylose tris[(S)- α -methylbenzylcarbamate]
 粒径： AS-RH 5 μ m、AS-3R 3 μ m
 出荷時の封入溶媒： AS-RH (水 / アセトニトリル = 60/40(v/v))
 AS-3R (水 / アセトニトリル = 50/50(v/v))

**CHIRALPAK® AY-RH, CHIRALPAK® AY-3R**

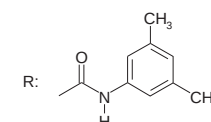
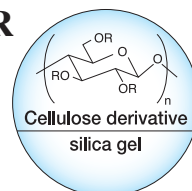
カラムエンド： ウォーターズタイプ
 不斉識別剤： Amylose tris(5-chloro-2-methylphenylcarbamate)
 粒径： AY-RH 5 μ m、AY-3R 3 μ m
 出荷時の封入溶媒： AY-RH (水 / アセトニトリル = 30/70(v/v))
 AY-3R (水 / アセトニトリル = 30/70(v/v))

**CHIRALPAK® AZ-RH, CHIRALPAK® AZ-3R**

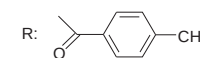
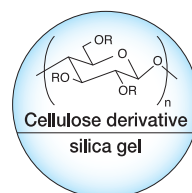
カラムエンド： ウォーターズタイプ
 不斉識別剤： Amylose tris(3-chloro-4-methylphenylcarbamate)
 粒径： AZ-H 5 μ m、AZ-3 3 μ m
 出荷時の封入溶媒： AZ-RH (水 / アセトニトリル = 50/50(v/v))
 AZ-3R (水 / アセトニトリル = 50/50(v/v))

**CHIRALCEL® OD-RH, CHIRALCEL® OD-3R**

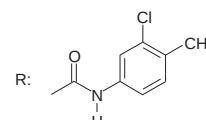
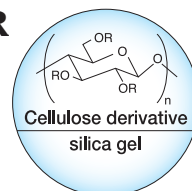
カラムエンド： ウォーターズタイプ
 不斉識別剤： Cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)
 粒径： OD-RH 5 μ m、OD-3R 3 μ m
 出荷時の封入溶媒： OD-RH (水 / アセトニトリル = 60/40(v/v))
 OD-3R (水 / アセトニトリル = 60/40(v/v))

**CHIRALCEL® OJ-RH, CHIRALCEL® OJ-3R**

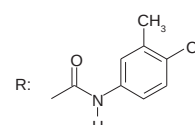
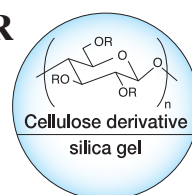
カラムエンド： ウォーターズタイプ
 不斉識別剤： Cellulose tris(4-methylbenzoate)
 粒径： OJ-RH 5 μ m、OJ-3R 3 μ m
 出荷時の封入溶媒： OJ-RH (水 / アセトニトリル = 80/20(v/v))
 OJ-3R (水 / アセトニトリル = 80/20(v/v))

**CHIRALCEL® OZ-RH, CHIRALCEL® OZ-3R**

カラムエンド： ウォーターズタイプ
 不斉識別剤： Cellulose tris(3-chloro-4-methylphenylcarbamate)
 粒径： OZ-RH 5 μ m、OZ-3R 3 μ m
 出荷時の封入溶媒： OZ-RH (水 / アセトニトリル = 40/60(v/v))
 OZ-3R (水 / アセトニトリル = 40/60(v/v))

**CHIRALCEL® OX-RH, CHIRALCEL® OX-3R**

カラムエンド： ウォーターズタイプ
 不斉識別剤： Cellulose tris(4-chloro-3-methylphenylcarbamate)
 粒径： OX-H 5 μ m、OX-3 3 μ m
 出荷時の封入溶媒： OX-RH (水 / アセトニトリル = 30/70(v/v))
 OX-3R (水 / アセトニトリル = 30/70(v/v))



3.1.2 | カラム使用条件

多糖系逆相カラム (CHIRALPAK® AD-RH/3R、AS-RH/3R、AY-RH/3R、AZ-RH/3R 及び CHIRALCEL® OD-RH/3R、OJ-RH/3R、OZ-RH/3R、OX-RH/3R) は以下の条件にてご使用下さい。

【表 -14：カラム使用条件】

通液方向	カラムのタグに明示されています。
圧力 ^①	カラムを長くお使いいただくため、30MPa(～305kgf/cm ²)を超えない範囲でのご使用をお勧めします。
pH ^②	pH2.0～9.0
温度範囲	5～40℃ (pH7 以下の水溶液使用時)、 5～25℃ (pH7 以上の水溶液使用時)

①圧力とは、カラム本体に掛かる背圧のことで、カラムを HPLC 装置に接続して通液した場合の系全体の圧力から、同条件でカラムを接続せずに通液した場合の圧力を差し引いた値です。
②pH7.0 以上でご使用になる時は、カラムの温度は 25℃以下にしてください。

3.1.3 | 使用可能溶媒

- ・アセトニトリル、メタノール、エタノール、2-プロパノール
 - ・p.32【表 -15: 推奨移動相】【表 -16: その他の水溶液】に記載のある水溶液（調製方法は p.34 参照）
- ※移動相に相溶する範囲で MTBE(メチル・tert-ブチルエーテル)を数%添加することで、選択性が向上する場合があります。

3.1.4 | カラム保護パーツ

カラムを長くお使い頂くために、ガードカートリッジの使用をお奨めいたします。
特に、pH7.0 以上でご使用になる際には、必ずご使用下さい。



ガードカートリッジ用ホルダー



ガードカートリッジ

ガードカートリッジを使用するためには、ガードカートリッジホルダーが必要です。
ガードカートリッジホルダーにガードカートリッジをセットし、短い配管を用いて本カラムの前に接続してください。

2.1.5 | サンプルの前処理

カラムの目詰まりによる圧力の上昇を防ぎ、カラムをより長くお使い頂くために、サンプル及び移動相をご使用前に、0.5μm 程度のメンブレンフィルターにて濾過して下さい。

2.1.6 | 装置の洗浄

出荷時に封止されている溶媒は、水 / アセトニトリルです（溶媒比は前ページ参照）。
ご使用にあたっては、カラムを接続する前に、HPLC 流路（ループを含みます）を下記の方法を参考に十分洗浄及び置換して下さい。

- 1) 緩衝液系あるいは塩水溶液系の移動相を使用した場合
→ 塩などを洗い流すために、「蒸留水あるいは水 (HPLC グレード)」で十分洗浄した後、エタノールで洗浄し、移動相に置換して下さい。
- 2) 順相系の移動相を使用した装置の場合
→ 移動相に置換して下さい。但し、使用する移動相と装置内の溶媒が混ざり合わない場合は、相溶性の溶媒で装置内を置換してからご使用ください。

3.1.7 | カラムに通液する前に

使用する移動相が緩衝液や塩水溶液を含む場合には、カラムの移動相置換は直接目的の移動相を通液せず、下記の要領で行って下さい。

- 1) (塩類を含まない) 水 (HPLC グレード) と有機溶媒の混合液（目的の溶離液と同じ混合比）を接続し、ポンプの流量を 0.5mL/min. で運転して下さい。
- 2) ポンプ出口と使用する分析カラムの入り口を接続して下さい。カラムの出口から液の流出が認められたら、検出器に接続して下さい。
- 3) 10～20 分程度通液した後、目的の移動相を通液してください。

3.1.8 | 注意事項

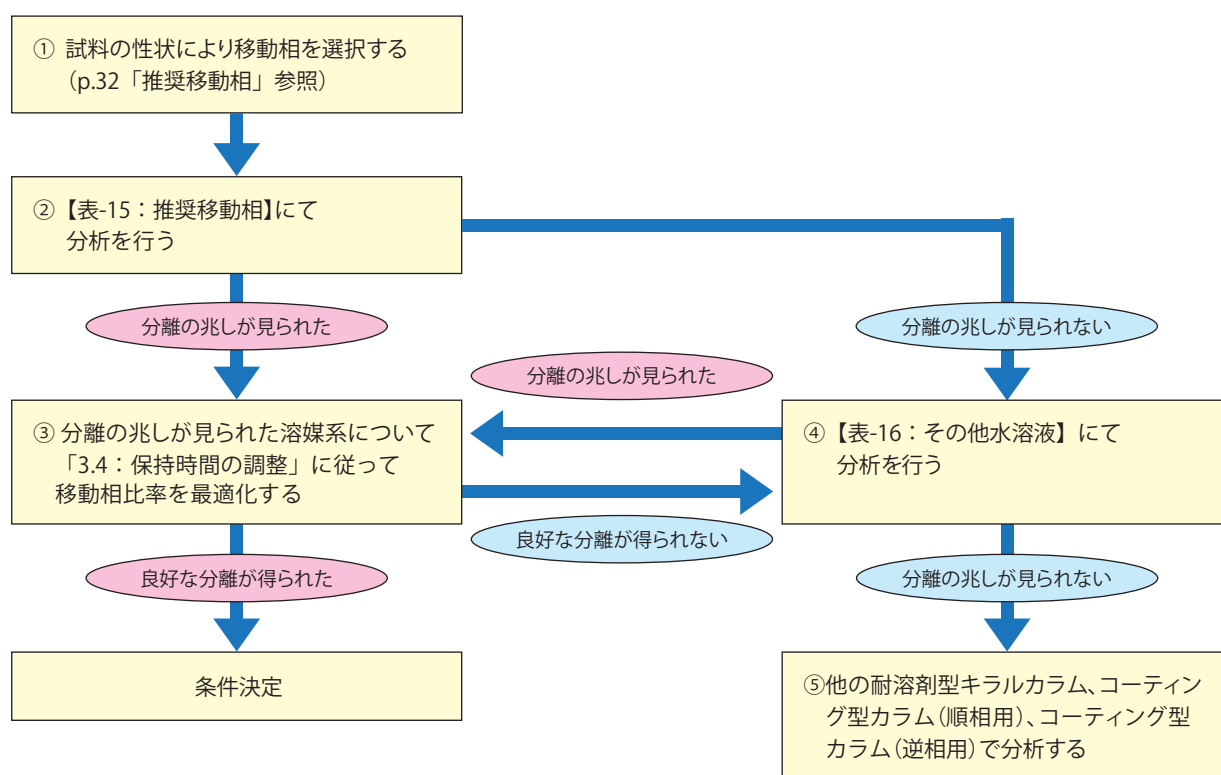
- ・カラムを長くお使い頂くために、専用のガードカートリッジをご使用下さい。
特に、pH7 以上でご使用になる場合は、専用のガードカートリッジを必ずご使用下さい。
- ・カラムに強い衝撃を与えたり、カラムを分解しないで下さい。
- ・装置中に、アセトン、クロロホルム、ジメチルホルムアミド (DMF)、ジメチルスルホキシド (DMSO)、酢酸エチル、塩化メチレン、テトラヒドロフラン (THF) などの溶媒が、たとえ微量でも混入していると、カラムを破壊する恐れがあります。カラムを HPLC 装置に接続する前に、必ず装置全体（インジェクターやインジェクションループを含む）を、次頁記載の推奨溶媒に従った移動相もしくはカラム保管溶媒に完全に置換して下さい。（特に、オートサンプラーのシリンジやニードルの洗浄液の溶媒置換は見落とし易いですのでご注意ください。）

3.2 移動相の選択

3.2.1 移動相選定の手順

- ① サンプルの性状に従って、移動相を選択します。
p.32「3.3.1 推奨移動相」をご参照下さい。
- ② p.32【表-15：推奨移動相】にて、分析を行います。
- ③ ②の分析で、分離の兆しが見られた場合、
p.35「3.4 保持時間の調節」に従って移動相組成を最適化します。
- ④ ②の分析で分離の兆しが見られない場合には、【表-16：その他の水溶液】
をお試し下さい。
- ⑥ 上記で良好な分離が得られない場合は、他のキラルカラムをお試しください。

移動相選定フローチャート



3.3 推奨移動相条件及び移動相調製方法

3.3.1 推奨移動相

分析する化合物の性質により、移動相の調製に使用する水溶液が異なります。
下記の移動相（【表-15：推奨移動相】）を第一に選択することをお勧めします。

【表-15：推奨移動相】

	酸性化合物	中性化合物	塩基性化合物 ^①
水溶液 ^①	ギ酸水溶液 pH2.0	水	DEA で pH9.0 に調整した 20mM 炭酸水素アンモにウム水溶液
有機溶媒 ^②	アセトニトリル、メタノール、エタノール、2-プロパノール、 テトラヒドロフラン、アセトン		
標準的な移動相 組成 ^③	水溶液 / 有機溶媒		

※表中の略語：DEA= ジエチルアミン

- ① 表-15:推奨移動相】で十分な分離が得られない場合には下記の水溶液（【表-16:その他の水溶液】）をお試し下さい。
水溶液の調製は、次頁記載の「3.3.2：移動相の調製方法（例）」をご参照下さい。

【表-16：その他の水溶液】

	酸性化合物	塩基性化合物
アミロース系カラム (CHIRALPAK® AD-RH/AD-3R, AS-RH/AS-3R, AY-RH/AY-3R, AZ-RH/AZ-3R)	50mM リン酸緩衝液 pH2.0	20mM ホウ酸緩衝液 pH9.0
	リン酸水溶液 pH2.0	
セルロース系カラム (CHIRALCEL® OD-RH/OD-3R, OJ-RH/OJ-3R, OX-RH/OX-3R, OZ-RH/OZ-3R)	50nmM リン酸水溶液 pH2.0	100mM KPF ₆ (または NaPF ₆) 水溶液
	リン酸水溶液 pH2.0	リン酸で pH2.0 に調整した 100mM KPF ₆ (または NaPF ₆) 水溶液
	リン酸で pH2.0 に調整した 100mM KPF ₆ (または NaPF ₆) 水溶液	

- ② ・一般に、有機溶媒の溶出力は、アセトニトリル、エタノール、メタノールの順です。
・有機溶媒としてアルコールを使用した場合、アセトニトリルに比べて背圧が高くなりますのでご注意ください。
・カラム性能を劣化させる恐れがありますので表記以外の有機溶媒をご使用にならないでください。
- ③ ・移動相は、ご使用する前に 0.5 μ m 程度の多孔質メンブレンフィルターで濾過して下さい。
・移動相は、水溶液とアセトニトリルの混合液（組成比は表 17 参照）から検討を始めることをお勧めします。
試料の溶出時間を調節したい場合は、移動相の組成比を調整して下さい。
（詳細は p35「保持時間の調節」をご覧ください。）
・カラムの温度を下げると、保持時間が長くなり分離係数が向上する場合があります。
（詳細は p35「保持時間の調節」をご覧ください。）
・カラムの温度を上げて流速を下げると、分離度が向上する場合があります。
（詳細は p35「保持時間の調節」をご覧ください。）
・有機溶媒は下表の範囲でご使用頂けますが、移動相の有機溶媒組成比が高くなると塩が析出しカラムの詰りの原因になります。

水溶液 / 有機溶媒
90/10 ~ 0/100

【表 -17：出荷時の移動相組成比】

	初期移動相組成比 (水 / アセトニトリル)
CHIRALPAK® AD-RH	60/40 (v/v)
CHIRALPAK® AD-3R	
CHIRALPAK® AS-RH	60/40 (v/v)
CHIRALPAK® AS-3R	50/50 (v/v)
CHIRALPAK® AY-RH	30/70 (v/v)
CHIRALPAK® AY-3R	
CHIRALPAK® AZ-RH	50/50 (v/v)
CHIRALPAK® AZ-3R	
CHIRALCEL® OD-RH	60/40 (v/v)
CHIRALPAK® OD-3R	
CHIRALCEL® OJ-RH	80/20 (v/v)
CHIRALPAK® OJ-3R	
CHIRALCEL® OX-RH	30/70 (v/v)
CHIRALPAK® OX-3R	
CHIRALCEL® OZ-RH	40/60 (v/v)
CHIRALPAK® OZ-3R	

- ④ ・酸性化合物の分離は、酸性の移動相を使用し、サンプルのイオン化を抑制することが効果的です。
 従って、「低濃度の強酸水溶液と水溶性有機溶媒の混合溶液」が最適な移動相です。
 ・シリカゲルの劣化を避けるため、強酸性水溶液 (<pH2.0) は使用しないで下さい。
- ⑤ ・塩基性化合物の分離では、アミロース系カラム、セルロース系カラムともに、塩基性の移動相を使用し、サンプルのイオン化を抑制する条件が第一推奨条件です。揮発性塩基性移動相として「ジエチルアミンで pH を調整した 20mM 炭酸水素アンモニウム水溶液と水溶性有機溶媒の混合溶液」が最適な移動相です。
 ・シリカゲルの劣化を避けるため、強塩基性水溶液 (>pH9.0) は使用しないで下さい。
 ・pH7.0 以上でご使用になる時は、カラム温度は 25℃以下にして下さい。
 ・強塩基が非常に強い試料は、シリカゲルを劣化させる恐れがあります。
- ⑥ ・【表 -15：推奨移動相】で良好な分離が得られない場合、【表 -16：その他の水溶液】を使用します。
 ・アミロース系カラムで塩基性化合物を分離する場合、塩基性の移動相を使用し、サンプルのイオン化を抑制することが効果的です。従って、「低濃度の塩基性緩衝液と水溶性有機溶媒の混合液」が最適な移動相です。
 ・セルロース系カラムで塩基性化合物を分離する場合、ヘキサフルオロリン酸カリウム等の塩を添加し、イオンペア・クロマトグラフィー的挙動を利用することが効果的です。
 従って、イオン化抑制条件で良好な分離が得られなかった場合、「ヘキサフルオロリン酸カリウム等の塩水溶液 / 水溶性有機溶媒の混合液」をお試し下さい。
 ・シリカゲルの劣化を避けるため、強塩基性水溶液 (>pH9.0) は使用しないで下さい。
 ・pH7.0 以上でご使用になる時は、カラム温度は 25℃以下にして下さい。
 ・強塩基が非常に強い試料は、シリカゲルを劣化させる恐れがあります。

3.3.2 | 移動相調製方法（例）

■ギ酸水溶液 (pH2.0) の調製方法

水 (HPLC グレード) にギ酸を添加し pH=2.0 に調整する。

■リン酸水溶液 (pH2.0) の調製調製

水 (HPLC グレード) にリン酸を添加し pH2.0 に調整する。

■リン酸緩衝液 (pH2.0) の調製方法

A 液： 50mM リン酸二水素カリウム水溶液
3.40g KH_2PO_4 / FW 136.09 を水 (HPLC グレード) に溶解させ、500mL の水溶液にする。
B 液： リン酸 (85wt% の H_3PO_4)
⇒ A 液に B 液を添加し、pH を 2.0 に調整する。

■20mM 炭酸水素アンモニウム水溶液 (pH9.0) の調製方法

A 液： 20mM 炭酸水素アンモニウム水溶液
0.79g NH_4HCO_3 / FW 79.06 を水 (HPLC グレード) で溶解し、500mL の水溶液にする。
⇒ A 液にジエチルアミンを添加し、pH を 9.0 に調整する。

■100mM ヘキサフルオロリン酸カリウム水溶液および ジエチルアミンで pH2 に調整した 100mM ヘキサフルオロリン酸カリウム水溶液の調製調製

A 液： 100mM ヘキサフルオロリン酸カリウム水溶液
⇒ 9.20g KPF_6 / FW 184.07 を水 (HPLC グレード) に溶解し、500mL の水溶液にする。
B 液： リン酸 (85wt% の H_3PO_4)
⇒ A 液に B 液を添加し、pH を 2.0 に調整する。

■20mM ホウ酸緩衝液 (pH9.0) の調製方法

A 液： 20mM ホウ酸水溶液
1.24g H_3BO_3 / FW 61.83 を水 (HPLC グレード) に溶解し、1L の水溶液にする。
B 液： 20mM 四ホウ酸ナトリウム十水和物水溶液
3.81g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ / FW 381.37 を水 (HPLC グレード) に溶解し、500mL の水溶液にする。
⇒ B 液に A 液を添加し、pH9.0 に調整する。

3.4 保持時間の調節

はじめに、p32の「3.3.1：推奨移動相」に従って決定した移動相にて分析を行ってください。

その結果、

A) 保持が弱く、分離が不十分な場合は → ●有機溶媒比を下げる。
→ ●カラム温度を下げる。

B) 保持が強すぎて

(1) 化合物が溶出しなかった場合や

(2) 短時間で分析したい場合

→ ●有機溶媒比を上げる。
→ ●カラム温度を上げる。

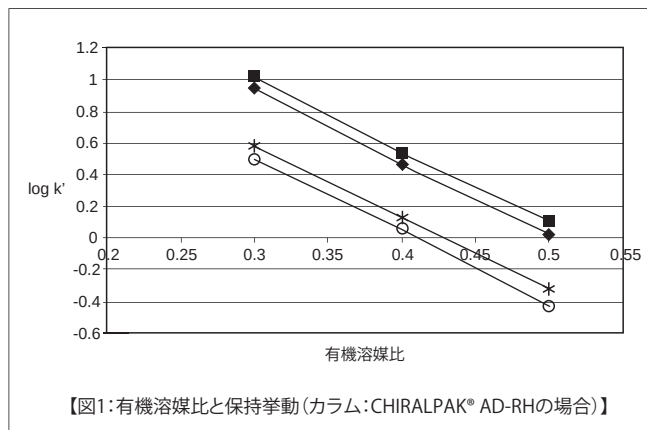
等の検討を行って下さい。

3.4.1 有機溶媒比の効果

保持や分離は、カラム温度に大きく影響を受けます。図-2に、カラム温度を5℃、25℃、40℃に設定したときのクロマト挙動への影響を比較します。

保持や分離には、有機溶媒の混合比が大きく影響します。図-1に、水とアセトニトリルの混合比を50/50、60/40、70/30に設定したときのクロマト挙動への影響を比較します。

- 有機溶媒比が高いほど、保持が弱く、分離も悪くなりますが、十分な分離が得られれば短時間で分析できます。
- 有機溶媒比が低いほど、保持が強く、分離も良好になりますが、ピークはブロードになります。従って、目的に応じた有機溶媒比を設定することが重要です。



3.4.2 有機溶媒の選択

保持や分離は有機溶媒の種類に大きく影響を受けます。下記表に、アセトニトリル、エタノール、メタノールを用いたときのクロマト挙動への影響を比較します。

有機溶媒	有機溶媒比	2-Methyltetralone			2-Phenyl-2-butanol		
		k1'	k2'	分離係数	k1'	k2'	分離係数
アセトニトリル	0.5	1.03	1.26	1.22	0.37	0.47	1.29
エタノール	0.65	0.92	1.06	1.15	0.37	0.37	1
メタノール	0.75	1.35	1.63	1.2	0.24	0.33	1.36

溶出力はおおよそそのような関係にあります。

水 / アセトニトリル = 50/50 ⇔ 水 / エタノール = 35/65 ⇔ 水 / メタノール = 25/75

また、多くの化合物がアセトニトリル系移動相でよりシャープなピークを与えます。

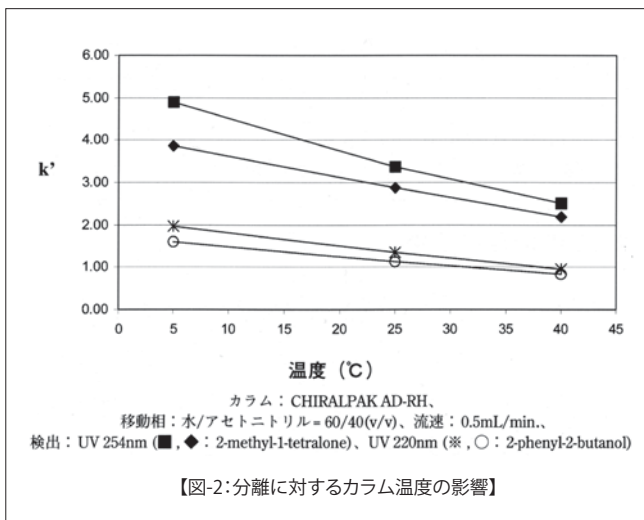
なお、溶媒の種類により溶出挙動が異なる化合物もあります。

3.4.3 | カラム温度の効果

保持や分離は、カラム温度に大きく影響を受けます。図-2 に、カラム温度を 5℃、25℃、40℃に設定したときのクロマト挙動への影響を比較します。

- 低温ほど、保持が強く、分離も良好ですが、ピークがブロードになります。
 - 高温では、保持が弱く、分離も悪くなりますが、十分な分離が得られる場合には短時間で分析できます。
- したがって、5～40℃の範囲で、目的に応じたカラム温度を設定することが重要です。

※pH7.0 以上でご使用になる場合は、25℃以下でご使用下さい。

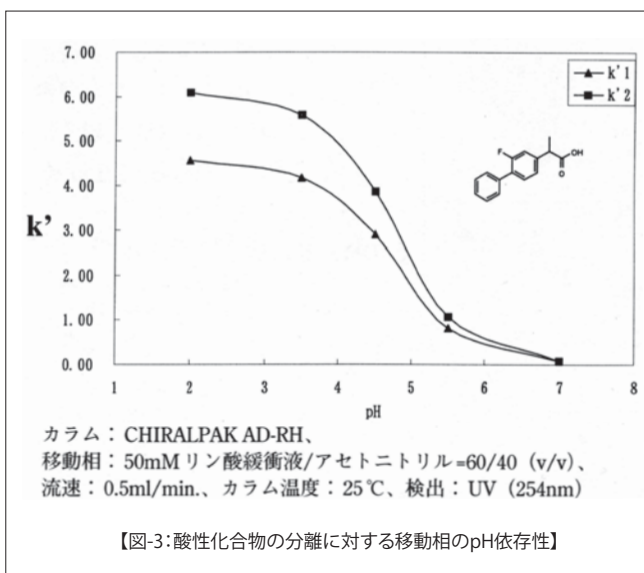


3.4.4 | 移動相の pH 値の影響（酸性化合物の場合）

フルルビプロフェンを例に、移動相として pH2.0～7.0 のリン酸緩衝液とアセトニトリルの混合溶媒を用いて、光学異性体の分離を試みました。図-3 は、その結果観察される移動相の各 pH（横軸）と、各エナンチオマーの k' （保持係数）（縦軸）の関係です。

フルルビプロフェンを例に、移動相として pH2.0～7.0 のリン酸緩衝液とアセトニトリルの混合溶媒を用いて、光学異性体の分離を試みました。図-3 は、その結果観察される移動相の各 pH（横軸）と、各エナンチオマーの k' （保持係数）（縦軸）の関係です。

- pH 値が低いほど保持が強く分離も良好。
- pH 値が高いほど保持が弱く分離も悪い。



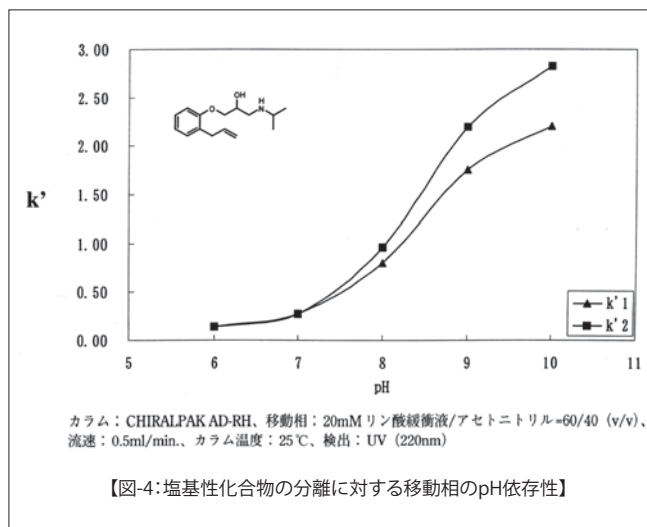
3.4.5 移動相の pH 値の影響（酸性化合物の場合）

アルプレノロール塩酸塩を例に、移動相として pH6.0 ～ 10.0 のリン酸緩衝液とアセトニトリルの混合溶媒を用いて、光学異性体の分離を試みました。図-4 は、その結果観察される移動相の各 pH（横軸）と、各エナンチオマーの k' （保持係数）（縦軸）の関係です。

pH 値の高い移動相中ではアルプレノロール塩酸塩のアミノ基のイオン化が抑制されるため、溶質の分配が固定相側へ傾き、保持は強められると推定できます。すなわち、塩基性化合物を効果的に分離するためには、分離したい化合物のイオン化を抑制するよう移動相の pH を高めに調整することが重要です（注）。

注) シリカゲル劣化を避けるため、pH2.0 ～ 9.0 の範囲でご使用下さい。

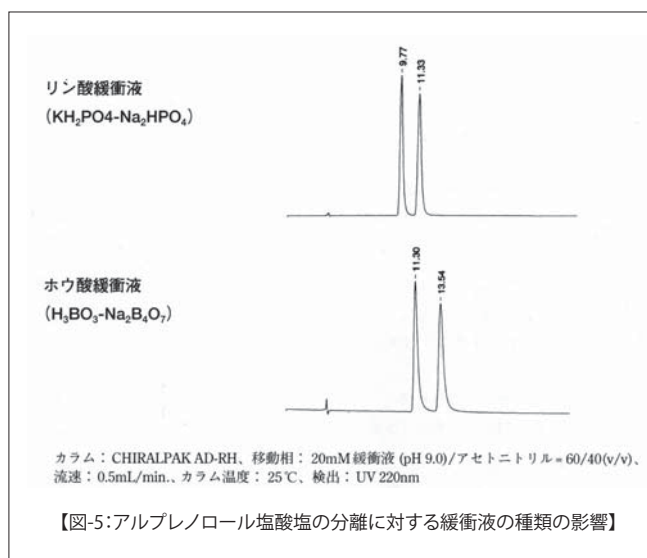
- pH 値が高いほど保持が強くて分離も良好。
- pH 値が低いほど保持が弱く分離も悪い。



3.4.6 緩衝液に用いる塩の種類の影響

アルプレノロール塩酸塩を例に、移動相として塩基性緩衝液とアセトニトリルの混合溶液を用いて、光学異性体の分離を試みました。

緩衝液調製に用いる塩の種類により保持時間が異なり、保持が強いほど良好に分離できます。即ち、保持および分離は緩衝液調製に用いる塩の種類により影響を受けます。



4章 多糖系キラルカラムのトラブルシューティング 編

目次へ

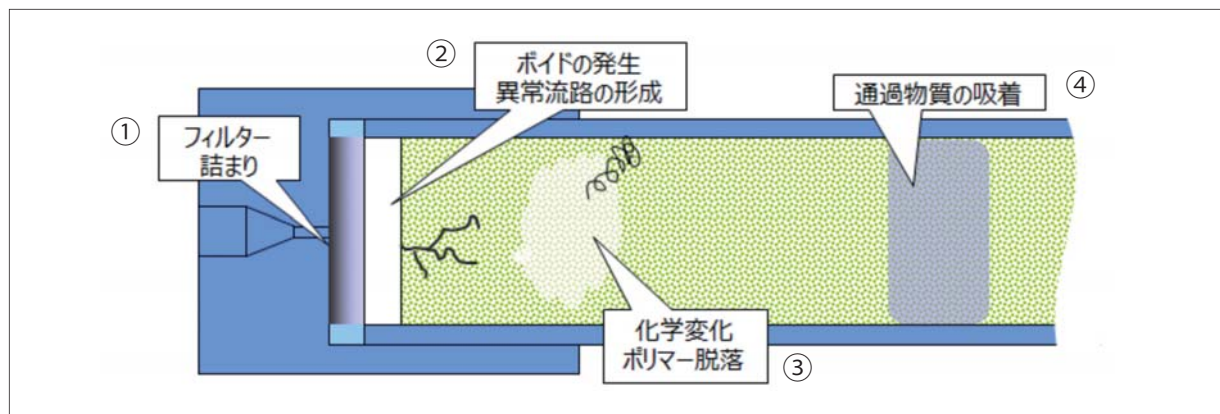
Trouble?



4章 多糖系キラルカラムのトラブルシューティング編

4.1	カラムトラブルとその対処法	39
4.2	カラム性能のチェック方法	39
4.3	装置の移動相置換時の注意点	40
4.4	サンプル洗浄液の影響	40
4.5	移動相中の水分の影響	40
4.6	溶媒履歴の影響(耐溶剤型キラルカラム)	41
4.7	メモリー効果(コーティング型・耐溶剤型キラルカラム)	41

4.1 カラムトラブルとその対処法



	フィルター詰まり	ボイド発生 異常流路の形成	化学変化	ポリマー脱落	通過物質の 析出・吸着
原因	移動相、試料中の 異物・不溶解物	過大圧力の負荷 禁止溶媒の通液	禁止溶媒の通液 反応性物質の注入	禁止溶媒の通液	難溶性物質の析出 強吸着性物質の 非特異的吸着
影響	カラム圧増大 フィルター変形・流路 不均一化による性能劣化	性能劣化（段数低下） 重度の場合はピーク ショルダー発生	性能劣化 カラム圧増大	性能劣化 カラム圧増大	カラム性能変化 ・劣化
対処	逆方向の通液洗浄 （軽度の場合）	なし	なし	ごく軽度なら洗浄	洗浄溶媒の通液

① フィルターの詰り

移動相、試料中の異物や不溶解物がフィルターに詰り、カラム圧増大、性能劣化を生じることがあります軽度の場合は逆方向の通液洗浄より解消することがあります。

② ボイド発生、異常経路の形成

使用範囲以上の圧力の負荷、禁止溶媒の通液により、カラム内でボイドが発生し段数低下やショルダーピークが発生したり、圧力損失の増大により通液できなくなることがあります。この場合、効果的な対処方法はありません。

③ 化学変化、ポリマー脱落

禁止溶媒の通液や反応性物質の注入により生じます。この場合、効果的な対処方法はありません。ポリマー脱落が軽度な場合は洗浄操作により、対処することが可能ですが、性能を初期の状態まで回復することは困難です。

④ 通過物質の析出・吸着

難溶性物質がカラム内に析出することにより、カラム性能変化・劣化を生じる場合があります。析出した物質の溶解溶媒を通液することにより、回復することがあります。

4.2 カラム性能のチェック方法

お使いのカラムの性能確認のため、以下を実施することをお奨めします。

ご購入後、カラムを使用される前に、カラムに添付されている出荷検査表記載、もしくはお客さまが定めたサンプル、条件で初期カラム性能評価を行います。

この際、**分離係数（ α 値）**、**保持係数（ k' ）**、**分離度（ R_s 値）**、**理論段数**、**ピーク対称性（ P_s 値）**を記録しておきます。

例えば・・・IC, ID, IF, AD, ODなどの出荷時評価サンプル

trans-Stilbene oxide アルドリッチ社 → (t_R 測定用サンプル)

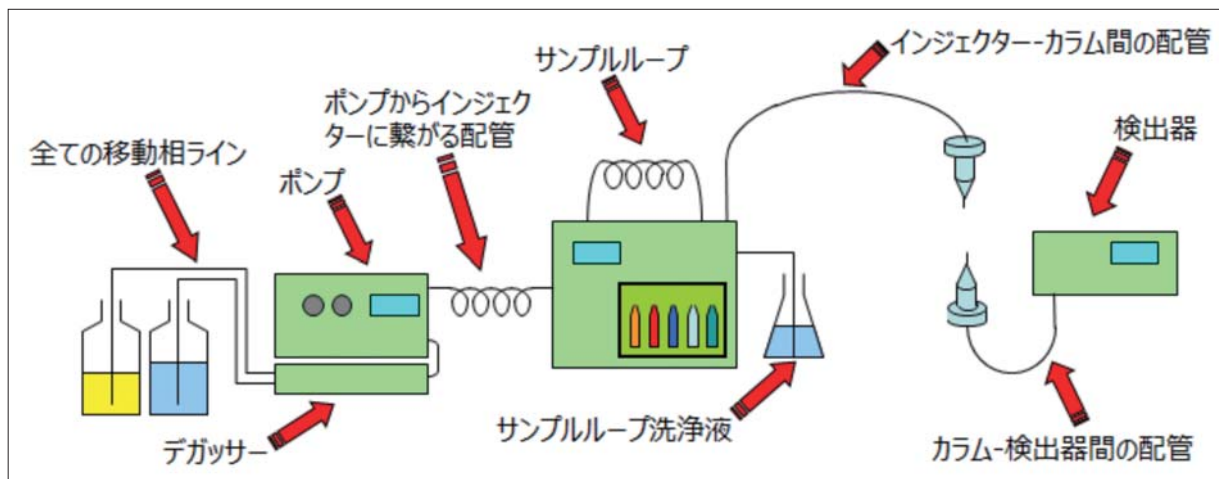
1,3,5-Tri-*tert*-butylbenzene アルドリッチ社 → (分離性能評価用サンプル)

カラムの使用頻度に合わせて、定期的に同一条件で評価することにより、現状の性能を確認することができます。

＜カラムを長くお使い頂くために＞

- ・カラム取り扱い説明書記載の方法で洗浄・保管する。
- ・酸や塩基を添加した移動相で使用した際には、すぐに洗浄する。
- ・ガードカートリッジを使用する。
- ・常用圧力を超えない範囲で使用する。

4.3 装置の移動相置換時の注意点



カラムを HPLC 装置に接続する前に…

必ず装置全体（インジェクターやサンプルループを含む）を、推奨溶媒に従った移動相もしくはカラム保管溶媒に完全に置換して下さい。

（オートサンプラーのシリンジやニードルの洗浄液の溶媒置換は見落としがちです。ご注意ください）

装置中に使用できない溶媒が微量でも混入していると、カラムを破壊する恐れがあります。

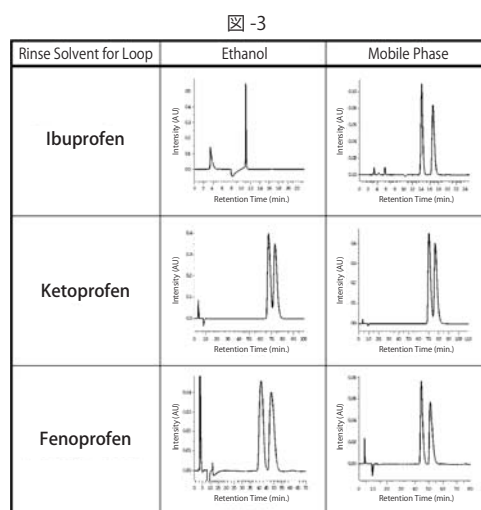
4.4 サンプル洗浄液の影響

サンプルループの洗浄液と移動相組成が異なると、分析結果に差が生じる場合があります。

図3にクロマト例を示します。

例えば、比較的、低い極性移動相使用時に、高極性のサンプルループ洗浄液を使用した場合、分離挙動が大きく変化する場合があります。（図-3 Ibuprofen）

比較的溶出力の弱いアルカンを多く含む移動組成において、分析する際にアルコールをサンプルループ洗浄溶媒に用いると、**保持が弱い化合物では分離しなくなるケース**もあります。保持が比較的強い化合物でも限定的ではありますが**分離が悪くなったり、ピーク形状が悪くなるケース**があります。

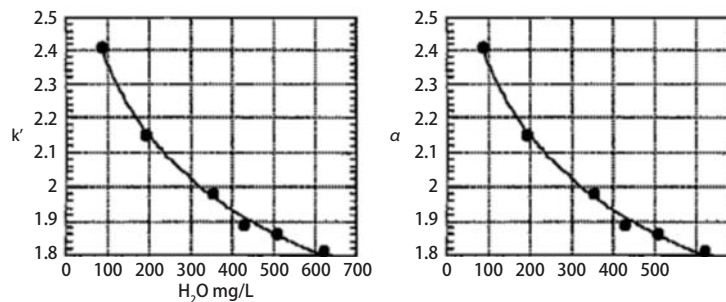


Column: CHIRALCEL® OD, Eluent: n-Heptane/2-Propanol/Trifluoroacetic acid=100/1/0.1, Flow rate: 1.0mL/min., Det.: UV254nm, Temp.: 25°C

4.5 移動相中の水分の影響

サンプルによっては、移動相中の水分量が分離に大きく影響することがあります。

図-4では移動相中の水分量を変化させた際の、保持係数（ k' 値）分離度（ α 値）をプロットしています。水分量が増加するに従い k' が顕著に減少し、結果的に α 値が小さくなっています。保持挙動の再現性に問題が発生した場合は、移動相中の水分の影響も原因の一つとしてご確認ください。



測定条件

サンプル: trans-Stilbene Oxide
カラム: CHIRALCEL® OD-H
移動相: n-Hex/IPA=90/10(v/v)

流速: 1.0mL/min.
温度: 25°C
検出: UV254nm

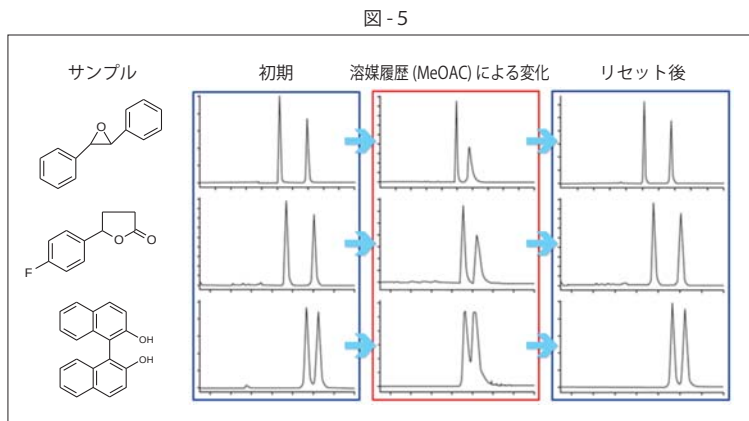
4.6 溶媒履歴の影響（耐溶剤型キラルカラム）

カラムに通液した溶媒の履歴により、分離挙動が変化することがあります。

図-5に、出荷直後の分析（初期条件）、酢酸メチル通液後さらにカラムのリセット注）後の分析において得られたクロマトを示します。

所定の手順でリセットすることにより、元の分離性能を得ることができる場合があります。

各品種カラムのリセット方法については P13 「カラム洗浄条件とリセット条件」をご参照ください。



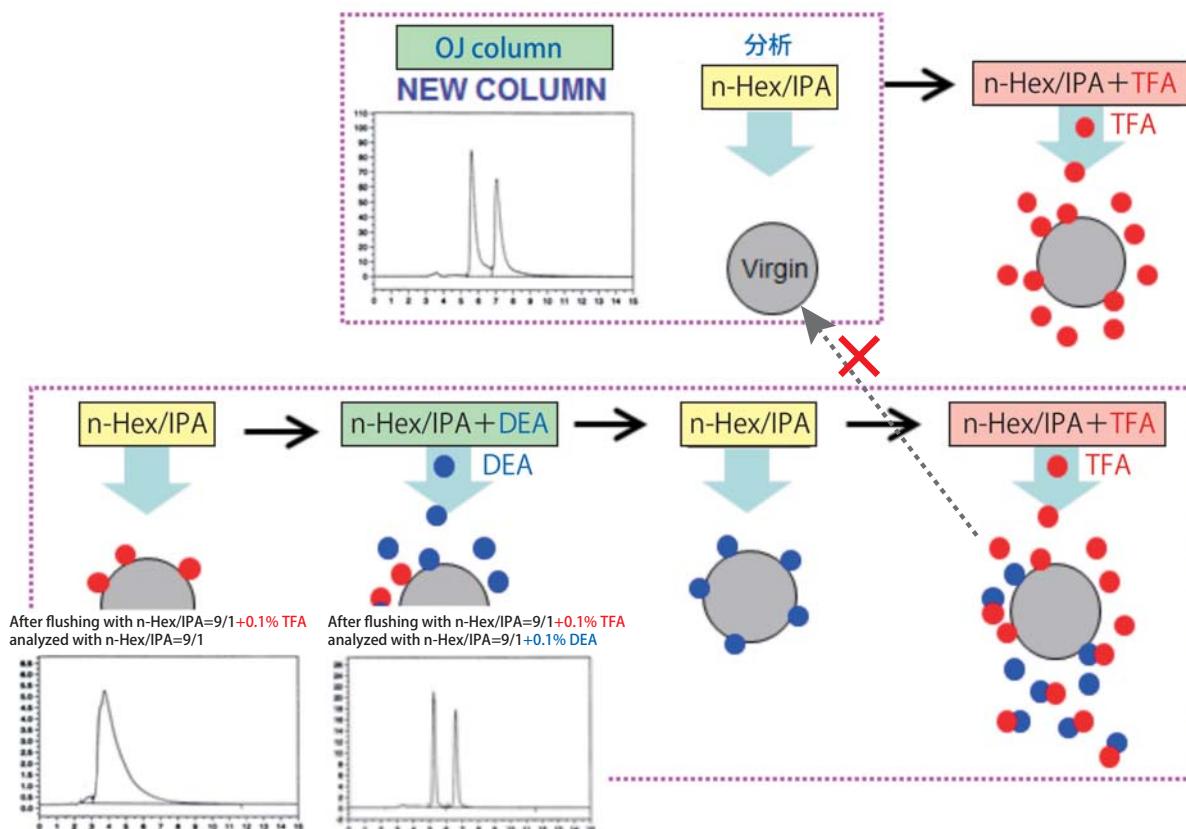
4.7 メモリー効果（コーティング型・耐溶剤型キラルカラム）

酸あるいは塩基添加剤を含む移動相を通液後、EtOH 等でカラム洗浄を行っても痕跡量の酸あるいは塩基添加剤が残留する場合があります、中性（無添加）移動相分析において分離に影響を及ぼす可能性があります。

図6においてその例を説明します。未使用カラムにて塩基性化合物を分析（n-Hex/IPA 移動相）した際、クロマト①のような分析結果が得られました。次に 0.1%TFA を含む n-Hex/IPA を通液後、元の移動相（n-Hex/IPA）を一定時間通液後、分析を行ったところ TFA の履歴により、クロマト②のようなブロードなピークが得られました。

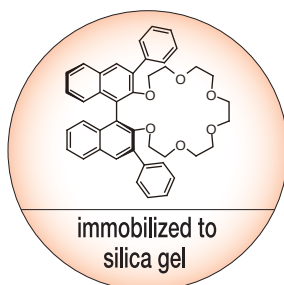
次に分析条件を変更し、0.1%DEA を含む n-Hex/IPA 移動相によって分析したところ、クロマト③のようなシャープな分離が得られました。これは充填剤に DEA が残留した、これは DEA によって分離に悪影響をもたらす TFA が完全に取り除かれ、塩基性化合物分析に好適な DEA 存在下で分析が行われたためです。一旦、TFA あるいは DEA の履歴（メモリー）が付いた場合、完全に取り除くことは難しく、上記のような再現性のない結果（クロマト①、クロマト②）となったものと考えられます。

酸性、塩基性化合物分析において再現性の良い結果を得るためには、適切な酸、塩基添加移動相を使用することをお奨めします。

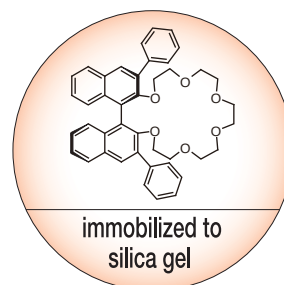


5章 クラウンエーテル型キラルカラム 編

CROWNPAK® CR-I(+)



CROWNPAK® CR-I(-)



【特長】

- CROWNPAK® は光学活性クラウンエーテルを使用したカラムです。クラウンエーテルで分離対象化合物のアンモニウムイオン ($-\text{NH}_3^+$) を包摂し、ビナフチルによる不斉環境で光学分割します。
- キラルセクターをシリカゲルに化学結合し、耐溶剤性を付与しています。
- 分離対象化合物はアミノ酸、アミノアルコール、アミン類など、不斉中心近傍に第一級アミノ基を有する化合物です。

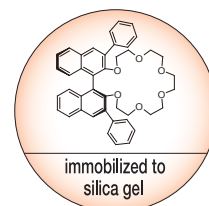
5章 クラウンエーテル型キラルカラム編

5.1	はじめに	43
5.1.1	カラムの仕様	43
5.1.2	カラム使用条件	43
5.1.3	使用可能溶媒	43
5.1.4	推奨移動相条件 (逆相系)	44
5.1.5	推奨移動相条件 (順相系)	45
5.2	分析条件の決定方法	46
5.2.1	分析条件決定フローチャート	46
5.2.2	pH 条件の効果	46
5.2.3	酸性添加剤の選択	47
5.2.4	有機溶媒の選択	47
5.2.5	カラム温度の影響	48
5.2.6	溶出順序の逆転について	48
5.3	CROWNPAK® CR-I を用いた分離例	49
5.3.1	α - アミノ酸、 β - アミノ酸、 γ - アミノ酸	49
5.3.2	アミン、アミノアルコール	49
5.3.3	ペプチド類	50
5.3.4	順相条件での分離例	50
5.4	CRPWNPAK® CR について	51
5.4.1	カラムの仕様	51
5.4.2	カラム使用条件	51
5.4.3	使用可能溶媒	51

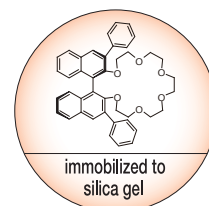
5.1.1 カラムの仕様

CROWNPAK® CR-I(+)

カラムエンド： ウォーターズタイプ
 不斉識別剤： (S)-18-crown-6 ether (シリカゲル化学結合型)
 粒子径： 5 μm
 出荷時の封入溶媒： 水 / メタノール = 95 / 5 (v/v)

**CROWNPAK® CR-I(-)**

カラムエンド： ウォーターズタイプ
 不斉識別剤： (R)-18-crown-6 ether (シリカゲル化学結合型)
 粒子径： 5 μm
 出荷時の封入溶媒： 水 / メタノール = 95 / 5 (v/v)



5.1.2 カラム使用条件

カラムサイズ (内径 × 長さ)	3.0×150mm 分析カラム
通液方向	カラムのタグに明示されています。
圧力範囲※	カラムを長くお使い頂くため、30MPa (~ 305 kgf/cm ²) を超えない圧力での使用をお勧めします。
pH(逆相移動相)	pH 1.0 ~ 7.0
温度範囲	-5 ~ 40 °C

※圧力とは、カラム自体にかかる背圧の最大値のことです。この背圧は、カラムを HPLC 装置に接続し、通液した場合の系内全体の圧力から、同条件でカラムを接続しない場合の系内全体の圧力を差し引いた値になります。

5.1.3 使用可能溶媒

CROWNPAK® CR-I(+)/CR-I(-) カラムには、一般にシリカゲルベースの HPLC 用カラムに使用できる移動相であれば、どのような移動相でもご使用いただけます。水 (酸性水溶液) / アセトニトリル、水 (酸性水溶液) / アルコールの混合系に加え、水と相溶するテトラヒドロフラン (THF)、アセトンのような溶媒も移動相としての使用が可能です。

また、CROWNPAK® CR-I(+)/CR-I(-) カラムは順相系移動相も使用できます。例えば、アルカン / アルコールの混合系で、より良い分離を得られることが多いようです。水系 (逆相) 移動相から有機溶剤系 (順相) 移動相へ、あるいは有機溶剤系 (順相) 移動相から水系 (逆相) 移動相へ置換する場合は、必ず相溶する溶媒 (エタノール、2-プロパノール) を介して置換を行ってください。

5.1.4 推奨移動相条件（逆相系）

水溶液 ^①	過塩素酸水溶液
有機溶媒 ^②	CH ₃ CN, MeOH, EtOH, IPA, THF, AT
標準的な移動相組成 ^③	過塩素酸水溶液 (pH 1.5) / CH ₃ CN = 80 / 20

※表中の略語：CH₃CN：アセトニトリル, MeOH：メタノール, EtOH：エタノール, IPA：2-プロパノール, THF：テトラヒドロフラン, AT：アセトン

- ① ・標準的には pH 1.0 ～ 2.0 でご使用いただくと、良い分離が得られます (pH7.0 までお使いいただけます)。
 ・pH を低くすると、一般に保持が長くなり良い分離が得られます。カラムを長くお使いいただくためには、満足のいく分離が得られる最も高い pH に条件を設定してお使い下さい。
 ・温度を下げると、保持が長くなり分離が良くなる傾向があります。
 ・硝酸やトリフルオロ酢酸などの過塩素酸以外の酸もご使用いただけますが、多くの場合、過塩素酸水溶液を使用した方が分離能力は高く、また移動相の UV 吸収も抑えることができます。
- ② ・一般に、有機溶媒の溶出力は、アセトニトリル、アセトン、THF、2-プロパノール、エタノール、メタノールの順です。
 ・有機溶媒としてアルコールを使用した場合、アセトニトリルに比べて背圧が高くなりますのでご注意ください。
- ③ ・移動相は、ご使用する前に 0.5 μm 程度の多孔質メンブレンフィルターでろ過して下さい。
 ・移動相は、水溶液とアセトニトリルの混合液（組成比 80/20 (v/v)）から検討を始めることをお勧めします。
 試料の溶出時間を調節したい場合は、移動相の組成比を調整して下さい。

水溶液の調製法について

（例）下記は目安の値ですので、pH 計などで pH を確認後、移動相としてご使用下さい。

pH 1.0 の過塩素酸水溶液の調整法

市販の 70% 過塩素酸水溶液 16.3g を HPLC 用水またはイオン交換水と混合し 1L にします。

pH 2.0 の過塩素酸水溶液の調整法

100 mL の pH 1.0 の過塩素酸水溶液を HPLC 用水またはイオン交換水と混合し 1L にします。

pH 1.5 の過塩素酸水溶液の調整法

316 mL の pH 1.0 の過塩素酸水溶液を HPLC 用水またはイオン交換水と混合し 1L にします。

pH 1.3 の過塩素酸水溶液の調整法

500 mL の pH 1.0 の過塩素酸水溶液を HPLC 用水またはイオン交換水と混合し 1L にします。

<注意事項>

- 移動相は脱気、もしくはヘリウムでパージしてからご使用下さい。
- 試料の保持の強さは試料の疎水性に依存します。疎水性試料は親水性試料に比べて保持されやすくなります。一方、分析対象試料が保持されない場合や分離が悪い場合には、移動相の pH を下げる、または温度を下げることで改善されることがあります。
- CROWNPAK® CR-I(+) / CR-I(-) は、分析温度が低いほど良好な分離が得られます。ただし疎水性化合物は低温下で吸着しやすい傾向がありますのでご注意ください。
- CROWNPAK® CR-I(+) / CR-I(-) は、K⁺ イオンによって分離が阻害されますので移動相には使用しないで下さい（カラム自体が損傷を受けることはありません）。
- カラムに強い衝撃を与えたり、カラムを分解しないで下さい。

<カラムの保管・洗浄 / その他>

- カラムをご使用後は、酸を含まない同一の組成の移動相をカラムに通液し、酸を完全に除去して下さい。試料は可能な限り移動相に溶かし、0.5 μm 程度の多孔質メンブレンフィルターで濾過してからご使用ください。
- 試料の打ち込み量が多いと分離が悪くなる原因になります。
- 試料が吸着した場合、アセトニトリルやメタノールなど試料が溶解しやすい溶媒を流速 0.2mL/min.、室温で 2 時間程度通液して下さい。
- 逆相条件で継続的にご使用になられる場合は、水 / メタノール混合液（組成比 95 / 5 (v/v)）に置換してカラムを保管して下さい。

5.1.5 推奨移動相条件（順相系）

第一推奨溶媒	n-ヘキサン / エタノール ^① / トリフルオロ酢酸 ^② / 水 ^③
初期条件 (v/v/v/v)	50 / 50 / 0.5 / 2.0

- ① エタノールの代わりに、2-プロパノールを使用することができますが、保持時間が極端に長くなる傾向があります。
- ② サンプル溶解性や分離能力の点から、トリフルオロ酢酸の使用をお勧めします。また、カラムを長くご使用いただくためには、トリフルオロ酢酸は 1.0% 以下での使用をお勧めします。
- ③ 水の添加によって、ピークのリーディングあるいはテーリングを解消することができますが、水の添加量が多いと、移動相が相溶しない場合があります。水の添加許容量は、アルコールの種類および比率によって変わりますが、n-ヘキサン / エタノールの比率が 50/50 の場合、水を最大 3% まで添加することができます。

<注意事項>

CROWNPAK® CR-I(+)/CR-I(-) は、出荷時に水 / メタノール = 95 / 5 で封止されています。

順相系移動相へ置換する場合は、必ず相溶する溶媒（エタノール、2-プロパノール）を介して置換を行ってください。

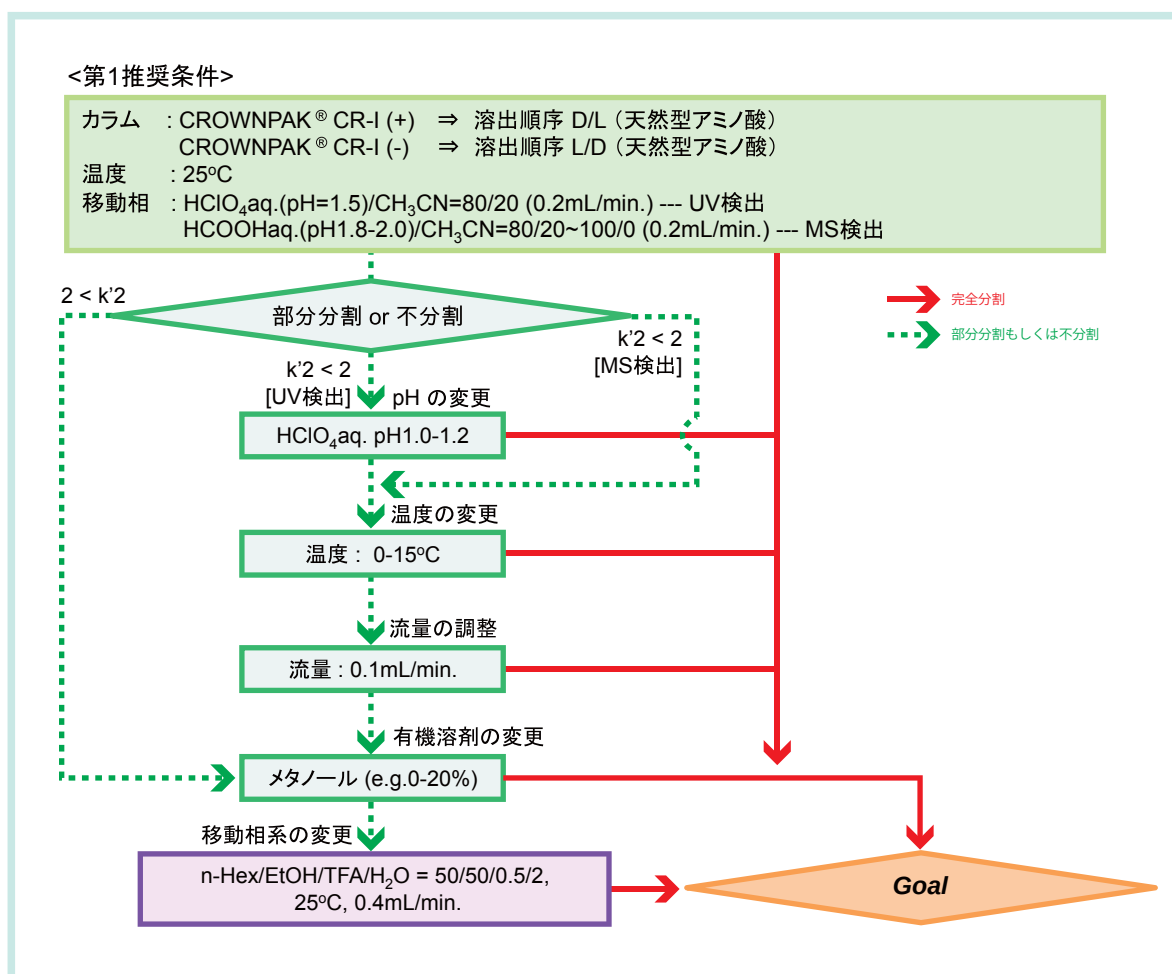
逆相系から順相系に置換したカラムは、保持時間の安定化に十分な通液が必要な傾向があります。

<カラムの保管・洗浄 / その他>

- カラムをご使用後は、酸および水を含まない同一の組成の移動相をカラムに通液し、完全に除去して下さい。
- 試料が吸着した場合、エタノールやメタノールなど試料が溶解しやすい溶媒を流速 0.2mL/min.、室温で 2 時間程度通液して下さい。
- 順相条件で継続的にご使用になられる場合は、n-ヘキサン / エタノール = 50 / 50 (v/v) に置換してカラムを保管して下さい。

5.2 分析条件の決定方法

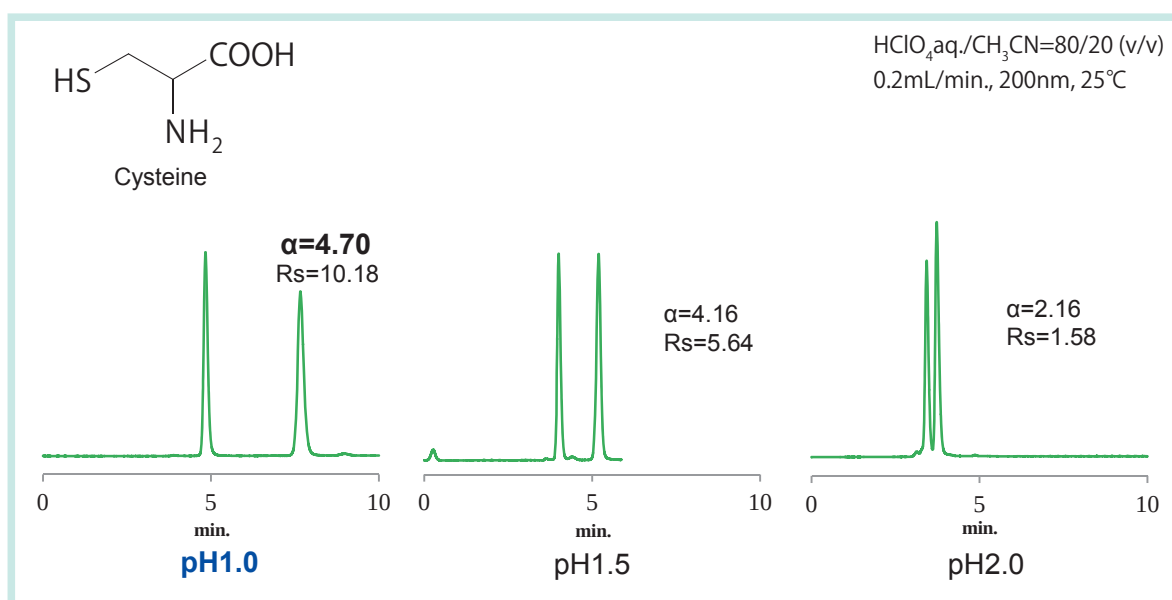
5.2.1 分析条件決定フローチャート



※略語: EtOH= エタノール、TFA= トリフルオロ酢酸、CH₃CN= アセトニトリル、HClO₄= 過塩素酸、HCOOH= ギ酸

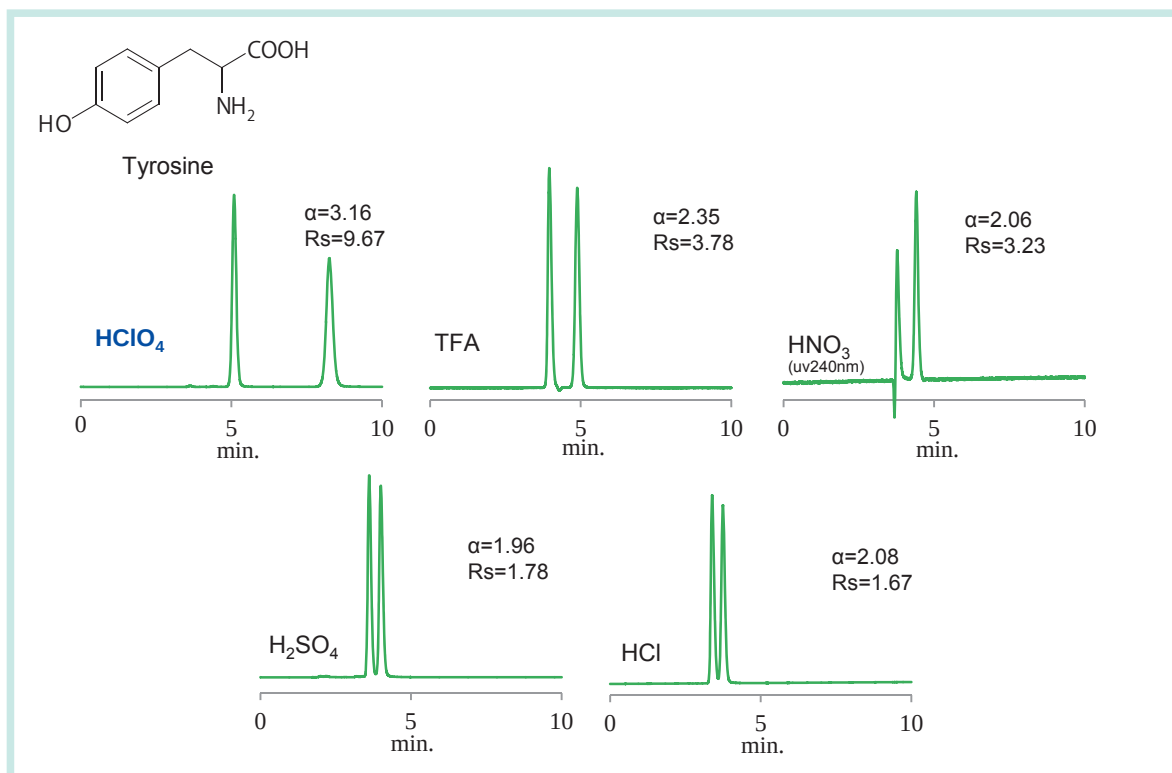
5.2.2 pH 条件の効果

CROWNPAK® は pH を下げることによって保持が長くなります。これにより分離は向上しますが、ピークはブロードになる傾向があります。



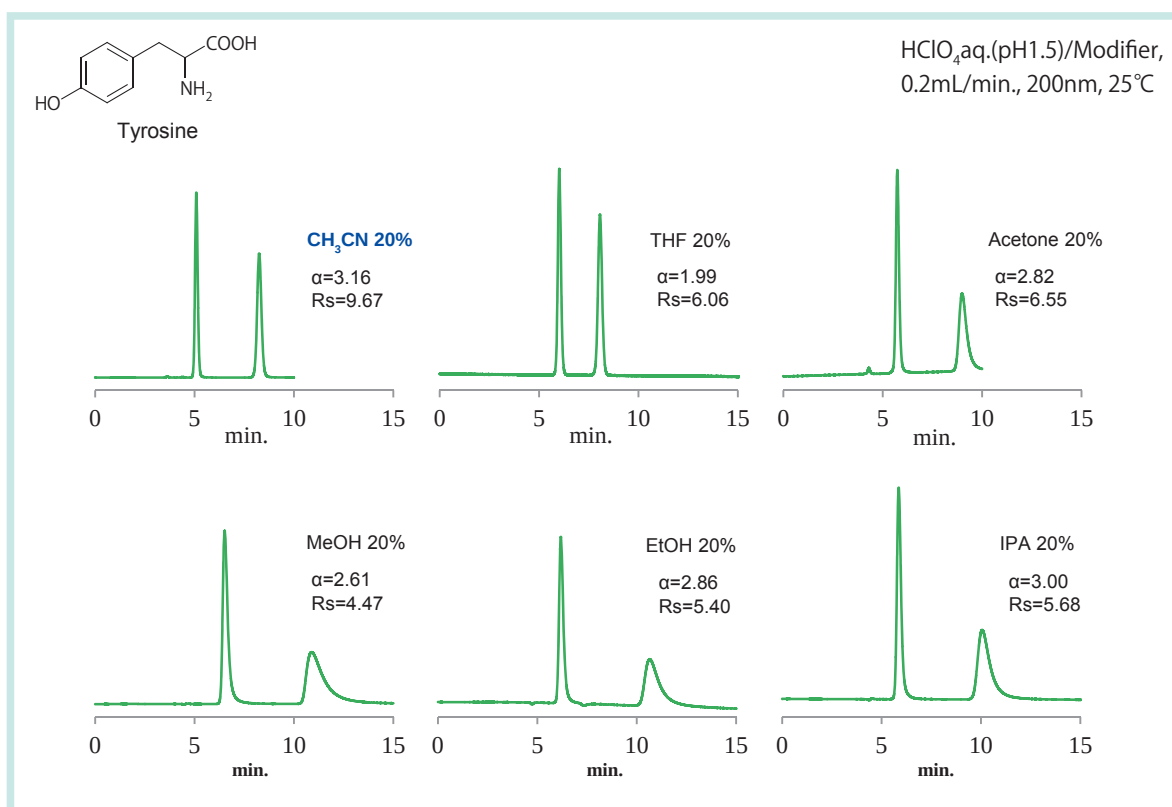
5.2.3 酸性添加剤の選択

強酸として知られている過塩素酸、TFA、硝酸、硫酸、塩酸の中でも過塩素酸が、最も良い分離が得られます。UV 検出感度の点でも過塩素酸が添加剤として優れています。



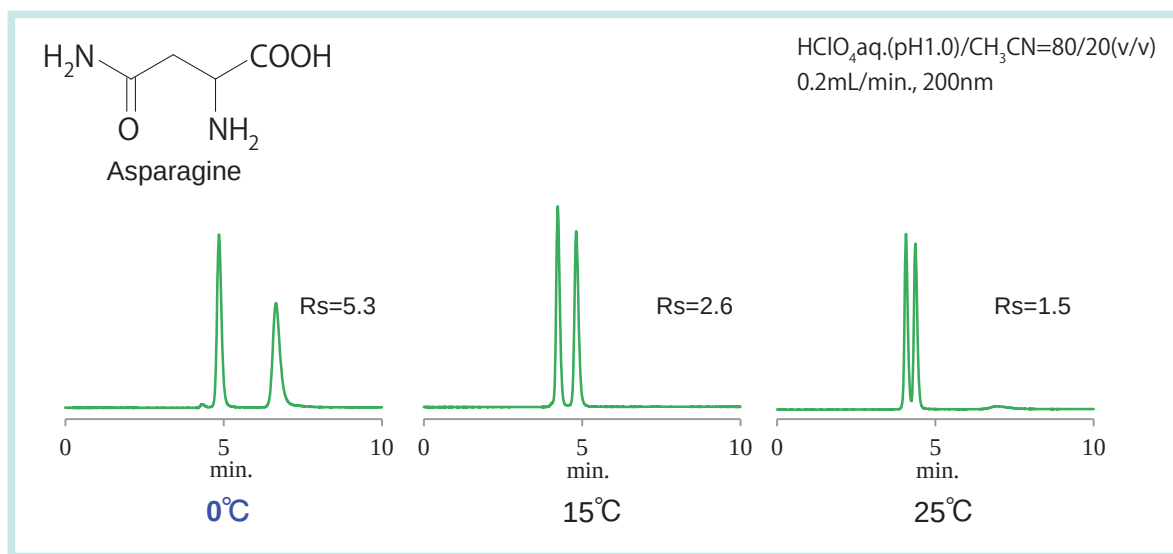
5.2.4 有機溶媒の選択

一般的に逆相系移動相で使用する有機溶剤 (CH₃CN、THF、Acetone、MeOH、EtOH、IPA) の中では、CH₃CN が最も優れた分離性能を与えます



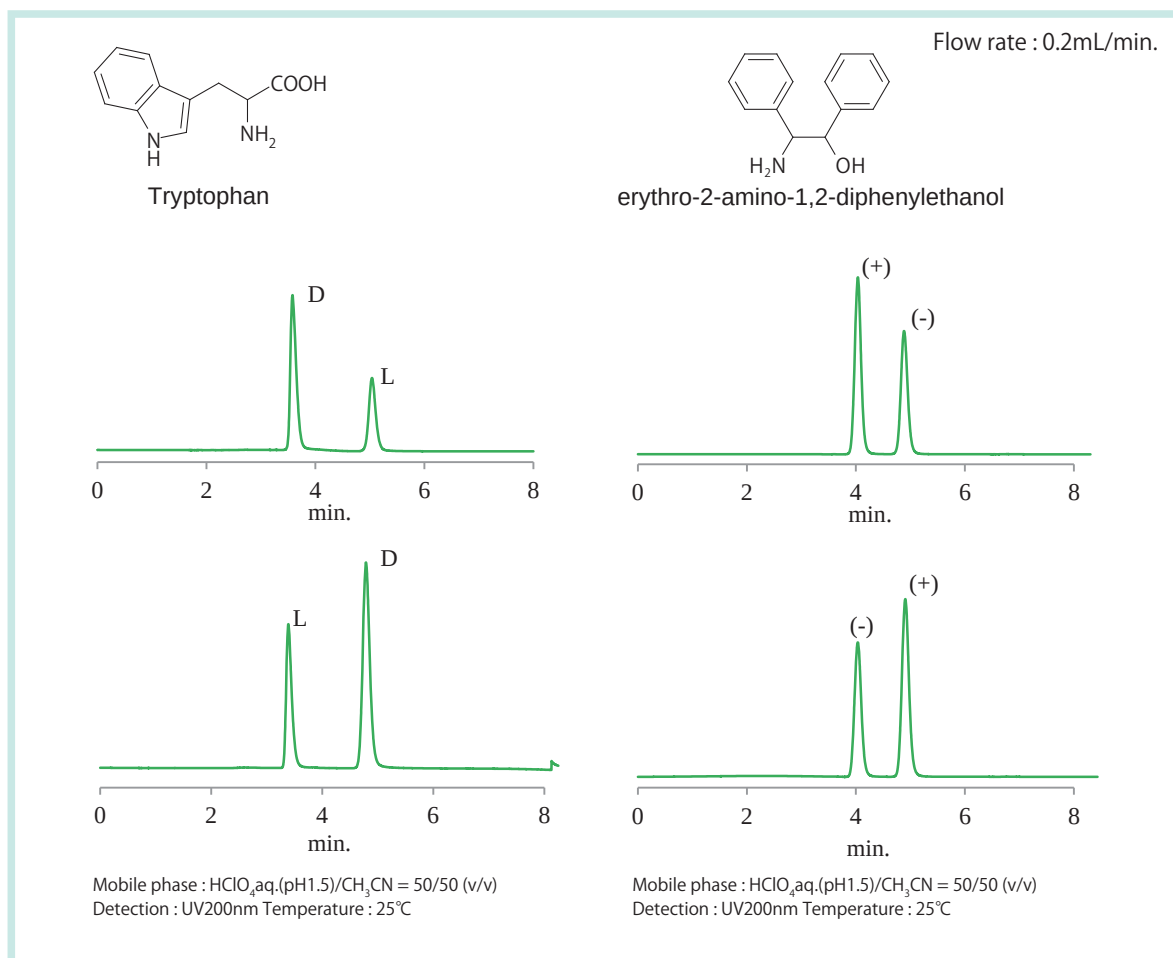
5.2.5 | カラム温度の影響

カラム温度を下げることによって、保持が長くなります。これにより分離は向上しますが、ピーク形状はブロードになります。



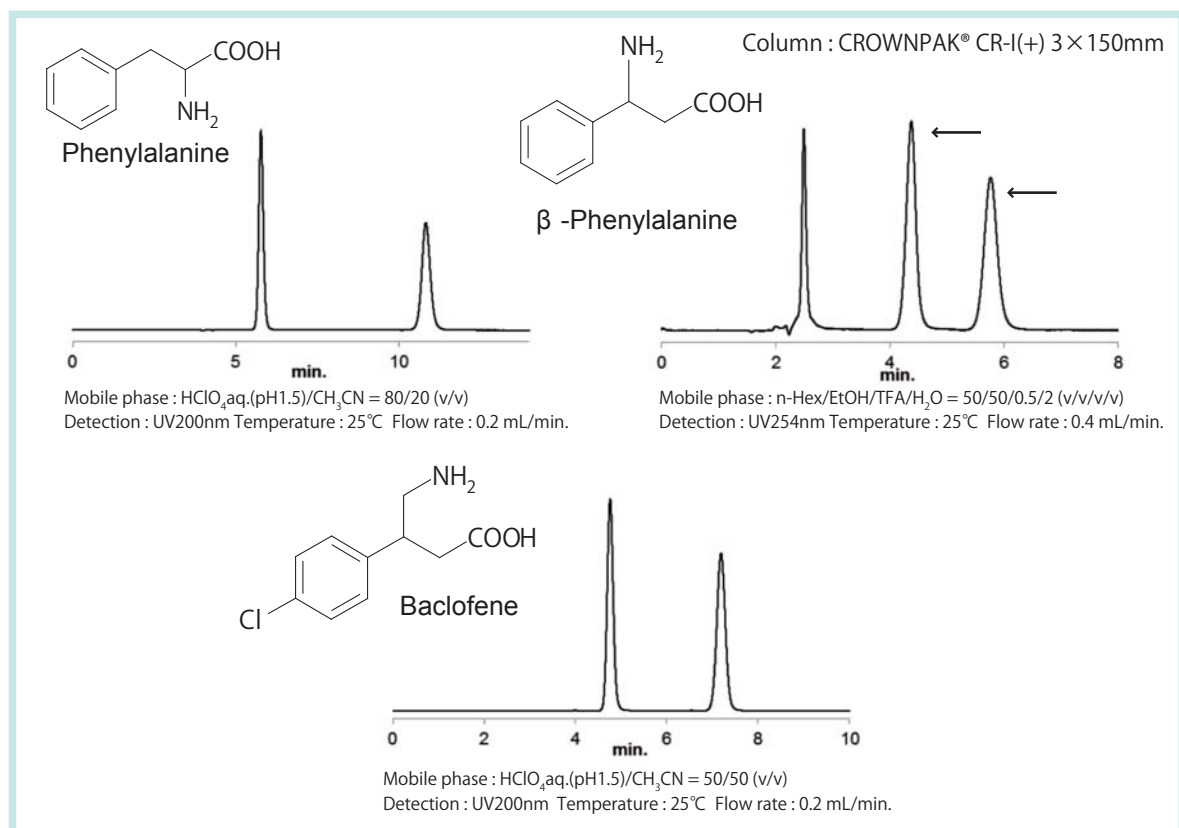
5.2.6 | 溶出順序の逆転について

CR-I(+), CR-I(-) を使い分けるわけることによって、分離すべき光学異性体の溶出順序を逆転させることができます。



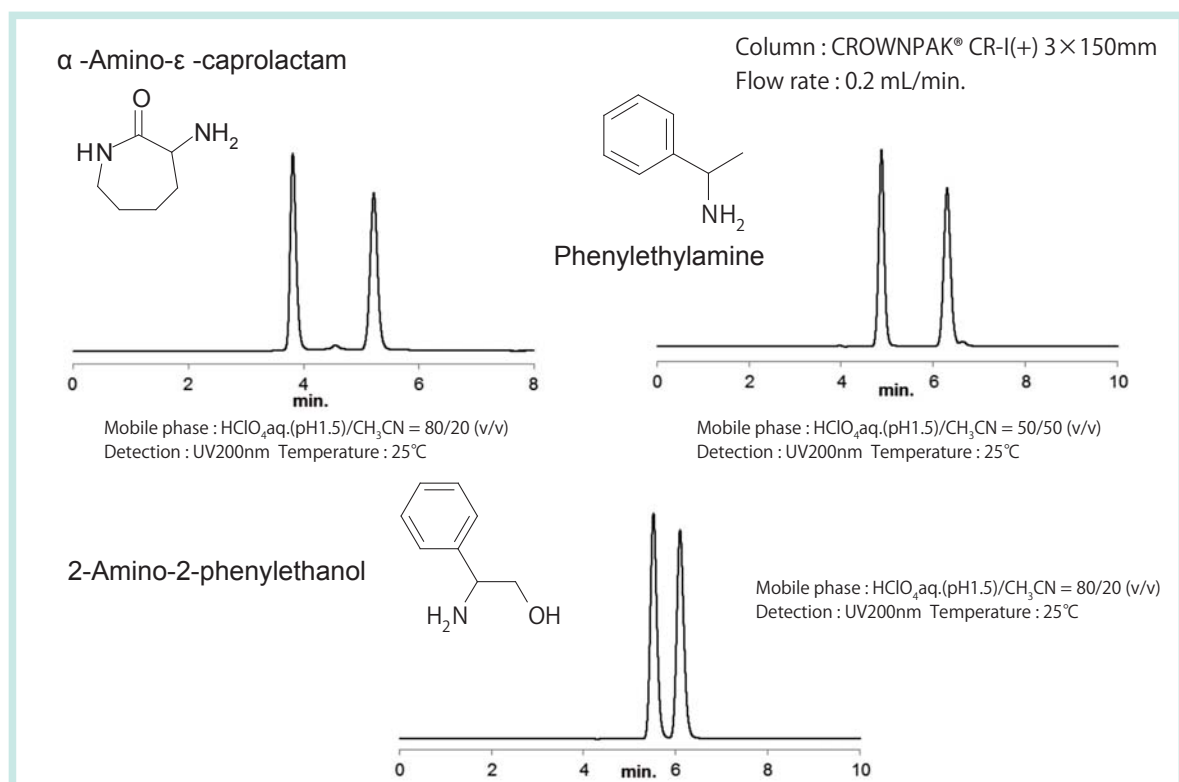
5.3 CROWNPAK® CR-I を用いた分離例

5.3.1 α -アミノ酸、 β -アミノ酸、 γ -アミノ酸

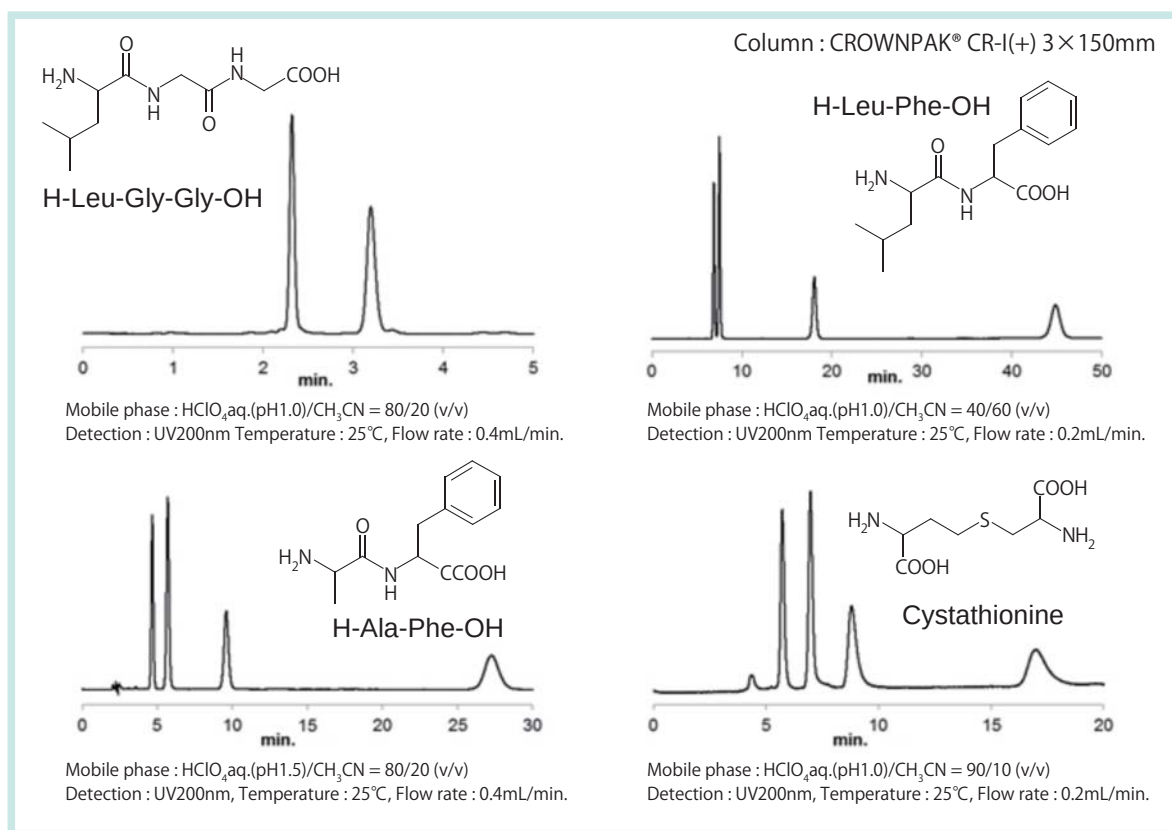


5.3.2 アミン、アミノアルコール

一般的に逆相系移動相で使用される有機溶剤 (CH_3CN 、THF、Acetone、MeOH、EtOH、IPA) の中では、 CH_3CN が最も優れた分離性能を与えます

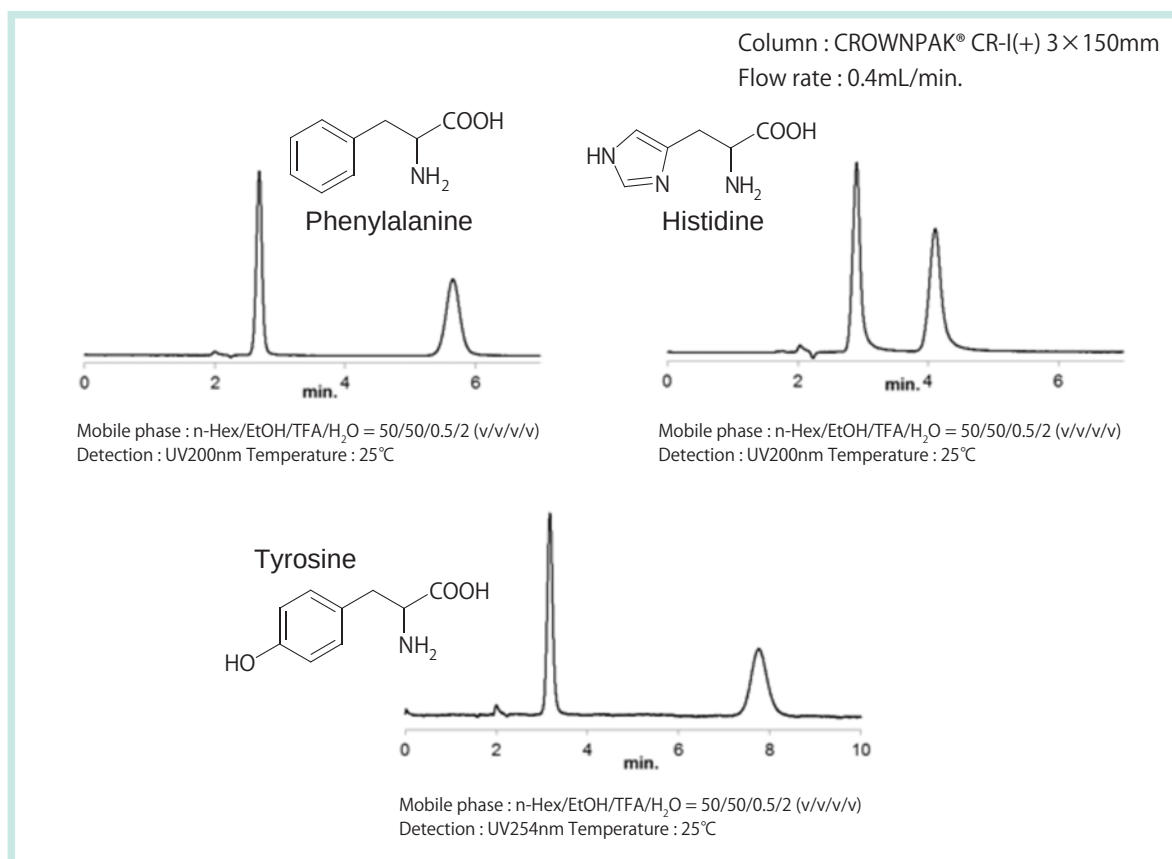


5.3.3 | ペプチド類



5.3.4 | 順相条件での分離例

CR-I(+), CR-I(-) を使い分けるわけることによって、分離すべき光学異性体の溶出順序を逆転させることができます。



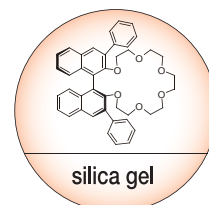
5.4 CROWNPAK® CR について

CROWNPAK® CR は CROWNPAK® CR- I と同じキラルセクターをシリカゲルにコーティングした商品です。分離機構などは CROWNPAK® CR- I と同じですが、カラムの使用範囲に制限があります。ここでは、CROWNPAK® CR の仕様、使用範囲、注意点について説明します。

5.4.1 カラムの仕様

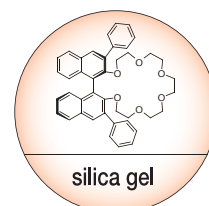
CROWNPAK® CR(+)

カラムエンド： ウォーターズタイプ
不斉識別剤： (S)-18-crown-6 ether (シリカゲルコーティング型)
粒子径： 5 μm
出荷時の封入溶媒： 水 / メタノール = 95 / 5 (v/v)



CROWNPAK® CR(-)

カラムエンド： ウォーターズタイプ
不斉識別剤： (R)-18-crown-6 ether (シリカゲルコーティング型)
粒子径： 5 μm
出荷時の封入溶媒： 水 / メタノール = 95 / 5 (v/v)



5.4.2 カラム使用条件

カラムサイズ (内径 × 長さ)	4.0×150mm 分析カラム
通液方向	カラムのタグに明示されています。
圧力範囲※	カラムを長くお使い頂くためには 15 MPa (153 kgf/cm ²) 以下での使用をお勧めします。
pH (逆相移動相)	pH 1.0 ~ 9.0
温度範囲	-5 ~ 50 °C

※圧力とは、カラム自体にかかる背圧の最大値のことです。この背圧は、カラムを HPLC 装置に接続し、通液した場合の系内全体の圧力から、同条件でカラムを接続しない場合の系内全体の圧力を差し引いた値になります。

5.4.3 使用可能溶媒

	過塩素酸水溶液 ^①	過塩素酸水溶液 ^① / メタノール ^②
CROWNPAK® CR(+)/CR(-)	100%	100/0 ~ 85/15

CROWNPAK® CR(+)/CR(-) はコーティングタイプのカラムですので、他の有機溶剤の使用や 15%を超えるメタノールを添加すると、カラムに損傷を与える原因となりますので、ご使用にならないでください。
メタノール以外の溶媒をご使用になりたい場合は、事前に弊社まで、ご確認ください。

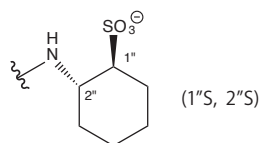
<移動相>

- ① ・標準的には pH 1.0 ~ 2.0 でご使用いただくと、良い分離が得られます (pH 9.0 までお使いいただけます)。
・pH を低くすると一般に良い分離が得られますが、カラムの寿命は短くなります。長くカラムをお使いいただくためには、満足のいく分離が得られる、最も高い pH に条件を設定してお使い下さい。
・硝酸やトリフルオロ酢酸などの過塩素酸以外の酸もご使用いただけますが、多くの場合、過塩素酸水溶液を使用した方が分離能力は高く、また移動相の UV 吸収も抑えることができます。
- ② ・メタノールを添加することで、溶出時間を短くすることができます。
ただし、他の有機溶剤を使用や 15%を超えるメタノールを添加すると、カラムに損傷を与える原因となりますので、ご使用にならないでください。

6 章 両性イオン交換型キラルカラム 編

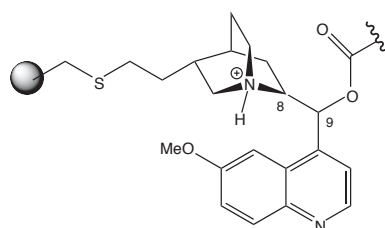
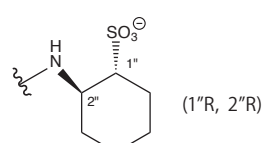
CHIRALPAK® ZWIX(+)

QUININE-DERIVED (8S, 9R)



CHIRALPAK® ZWIX(-)

QUININE-DERIVED (8R, 9S)



Covalently bonded on 3 μ m spherical silica gel

【特長】

- CHIRALPAK® ZWIX(+)/ZWIX(-) の固定相は、基材であるシリカゲルにキラルセクターとして trans-2-aminocyclohexane sulfonic acid (ACHSA) で誘導体化した chinchona alkaloid を化学結合しています。
- アニオン交換基とカチオン交換基の両方を働かせることによって、アミノ酸などの両性化合物を分離します。
- ZWIX(+) と ZWIX(-) のキラルセクターは、擬似的な光学異性体の関係にあるため、ほとんどの場合、分析対象化合物の溶出順序を逆転させることができます。

6 章 両性化合物分析用キラルカラム 編

6.1	はじめに	53
6.1.1	カラムの仕様	53
6.1.2	カラム使用条件	53
6.1.3	カラムの特性	53
6.1.4	注意事項および洗浄・保管方法	53
6.2	分析条件の決定方法	54
6.2.1	一般的な分析条件設定方法	54
6.2.2	溶剤の影響	55
6.2.3	溶出順序の変更	55
6.2.4	LC-MS への応用について	56
6.3	CHIRALPAK® ZWIX を用いた分離例	56
6.3.1	アミノ酸（フリー体）の分離例	56
6.3.2	誘導体化したアミノ酸の分離例	56
6.3.4	環状2級アミノ酸およびアルキル側鎖を持つアミノ酸の分離例	57
6.3.5	ジペプチド、トリペプチドの分離例	57
6.3.6	その他、分離実績のある化合物	57

6.1.1 カラムの仕様

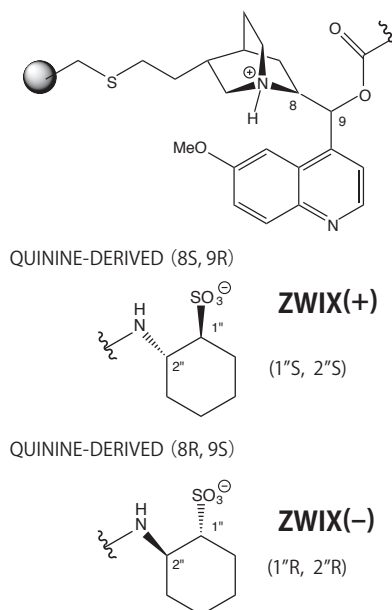
CHIRALPAK® ZWIX(+)

カラムエンド： ウォーターズタイプ
 不斉識別剤： (S,S)-ACHSA(*) 結合 quinine (シリカゲル化学結合型)
 粒子径： 3 μ m
 出荷時の封入溶媒： 100 % メタノール

CROWNPAK® ZWIX(-)

カラムエンド： ウォーターズタイプ
 不斉識別剤： (R,R)-ACHSA(*) 結合 quinidine (シリカゲル化学結合型)
 粒子径： 3 μ m
 出荷時の封入溶媒： 100 % メタノール

(*)trans-2-aminocyclohexanesulfonic acid(ACHSA)



6.1.2 カラム使用条件

カラムサイズ (内径 × 長さ)	3 x 150 mm 3 x 250 mm	分析用カラム	4 x 150 mm 4 x 250 mm	分析用カラム
通液方向	カラムのタグに明示されています。			
流量範囲	0.2 ～ 0.5mL/min		0.3 ～ 1.0mL/min	
圧力範囲※	カラムを長くお使い頂く為、30MPa（～ 305 kgf/cm ² ）を超えない圧力でのご使用をお勧めします。			
温度範囲	5 ～ 45℃			

*圧力とは、カラム自体にかかる背圧の最大値のことです。この背圧は、カラムを HPLC 装置に接続し、通液した場合の系内全体の圧力から、同条件でカラムを接続しない場合の系内全体の圧力を差し引いた値になります。

6.1.3 カラムの特性

- CHIRALPAK® ZWIX(+) と CHIRALPAK® ZWIX(-) は、フリーのアミノ酸を分離することが出来る両性イオン (zwitterionic) 交換型の光学分割用カラムです。これらのカラムは、特に誘導体化していないアミノ酸やペプチドなど両性イオン化合物の光学異性体分離に優れています。
- CHIRALPAK® ZWIX(+) と CHIRALPAK® ZWIX(-) は、移動相条件が MS 検出 / 同定に適しています。したがって UV 吸収の弱いアミノ酸の分析に役立ちます。
- CHIRALPAK® ZWIX(+) と CHIRALPAK® ZWIX(-) のキラルセクターは擬似的なエナンチオマーの関係にあるため、これらのカラムを使い分けることによって、エナンチオマーの溶出順序を逆転させることができます。ただし、2 種類のカラムでまったく同じ分離 (保持時間とエナンチオ選択性) が得られるとは限りません。
- これらのカラムには、一般的に HPLC 用として用いられる溶媒 (メタノール、アセトニトリル、テトラヒドロフラン、水等) は全てご使用いただけます。

6.1.4 注意事項および洗浄・保管方法

使用開始時の注意

カラムをご購入後、最初に使用される際には、分析に用いる移動相をカラム体積の 20 倍以上 (約 30-40mL) 通液してカラムを平衡化させてから、分析を開始して下さい。

カラムの洗浄

100% メタノールや 100% アセトニトリルでカラムを洗浄することが出来ます。これらの溶媒と水との混合溶媒 (50:50,v/v) も効果的です。

カラムの保管

カラムを長期間保管する場合は、カラム体積の 20 倍の 100% メタノールで置換してからカラムを保管して下さい。なお、カラムは室温で保管していただけます。

6.2 分析条件の決定方法

6.2.1 一般的な分析条件設定方法

両性イオン交換モードでは、両性のイオン交換の平衡に関与するすべてのイオン種が、移動相によって効果的に溶媒和されなければなりません。したがって、移動相に用いる溶媒には十分なプロトン活量 (proton activity) が必要です。

移動相の組成

CHIRALPAK® ZWIX(+) と CHIRALPAK® ZWIX(-) を用いたキラル分析において、優れたプロトン性溶媒であるメタノールは、重要な移動相成分です。

溶出強度と分離の程度を調整するため、移動相の組成として、メタノールにアセトニトリルまたはテトラヒドロフランを混合した溶媒を使用します (望ましくは、メタノール $\geq$ 20vol%)。メタノールの比率を大きくすると、両性イオン化合物の保持時間を短くすることが出来ます。

移動相への水の添加 (2 ~ 20vol%) は、両性イオン化合物の溶出の促進や、MS 検出感度の改善、分析中のサンプル析出防止、特定のサンプルで起こるピークテーリングの抑制に効果があります。

添加剤

キラルセクターの分子内対イオン効果のため、移動相中に酸性添加剤と塩基性添加剤を組み合わせる必要があります。CHIRALPAK® ZWIX(+) と CHIRALPAK® ZWIX(-) では、50mM ギ酸 (FA)-25mM ジエチルアミン (DEA) の組合せを様々な両性化合物の分析に用いることができます。これらの添加剤も移動相のプロトン活量に寄与します。

完全に LC-MS 条件に適応させるため、ギ酸 / DEA を、ギ酸 / ギ酸アンモニウムあるいはギ酸 / アンモニアに置き換えることが出来ます。LC-MS で使用される際には、次の初期条件からお試しになることをお勧めします。

25mM ギ酸 + 25mM ギ酸アンモニウム in MeOH/H₂O 98:2 (v/v)

・分析初期条件¹⁾

移動相組成： (1) ^(*). MeOH / CH₃CN / H₂O = 49:49:2 (v/v/v) 50mM ギ酸 + 25mM DEA

(2). MeOH / THF / H₂O = 49:49:2 (v/v/v) 50mM ギ酸 + 25mM DEA

流速： 3×150mm カラムの場合 → 0.4-0.5 ml/min 4×150mm カラムの場合 → 0.8-1.0 ml/min

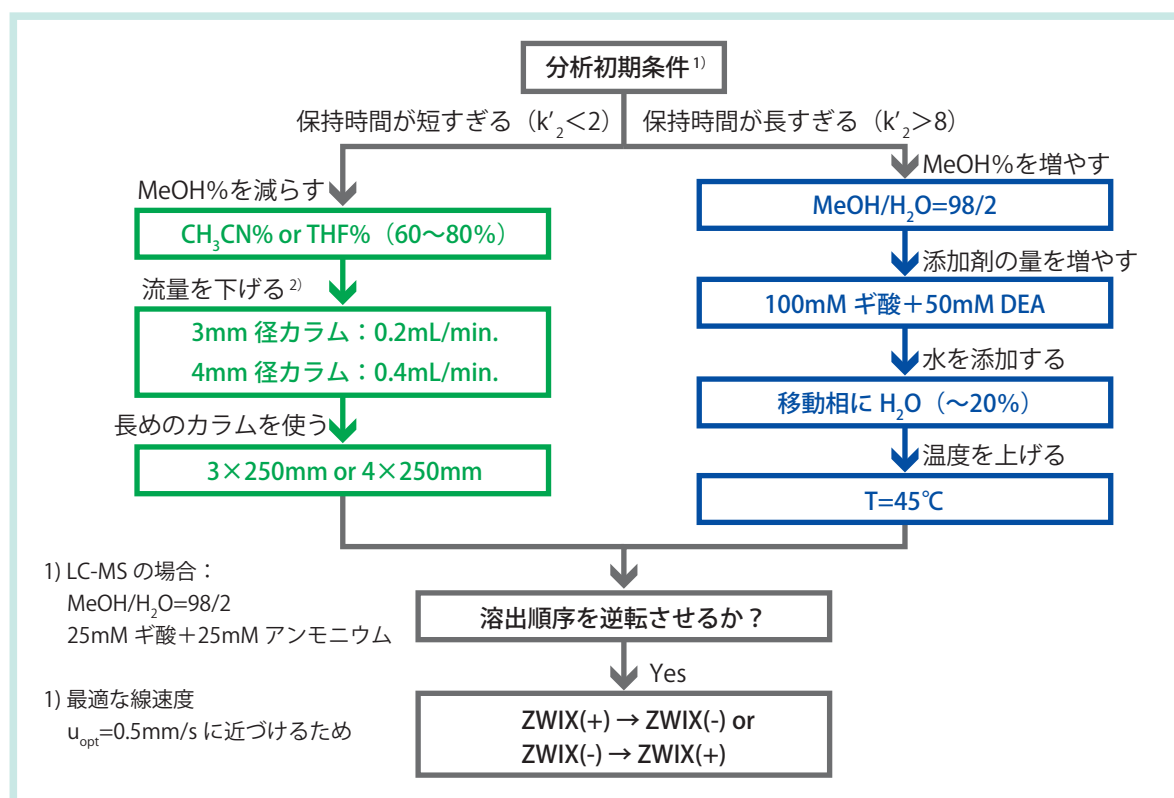
カラム温度： 25℃

(*) 移動相の調製方法：

移動相の混合溶媒 (1L スケール)： MeOH 490mL と CH₃CN 490mL と水 20mL を混合する。

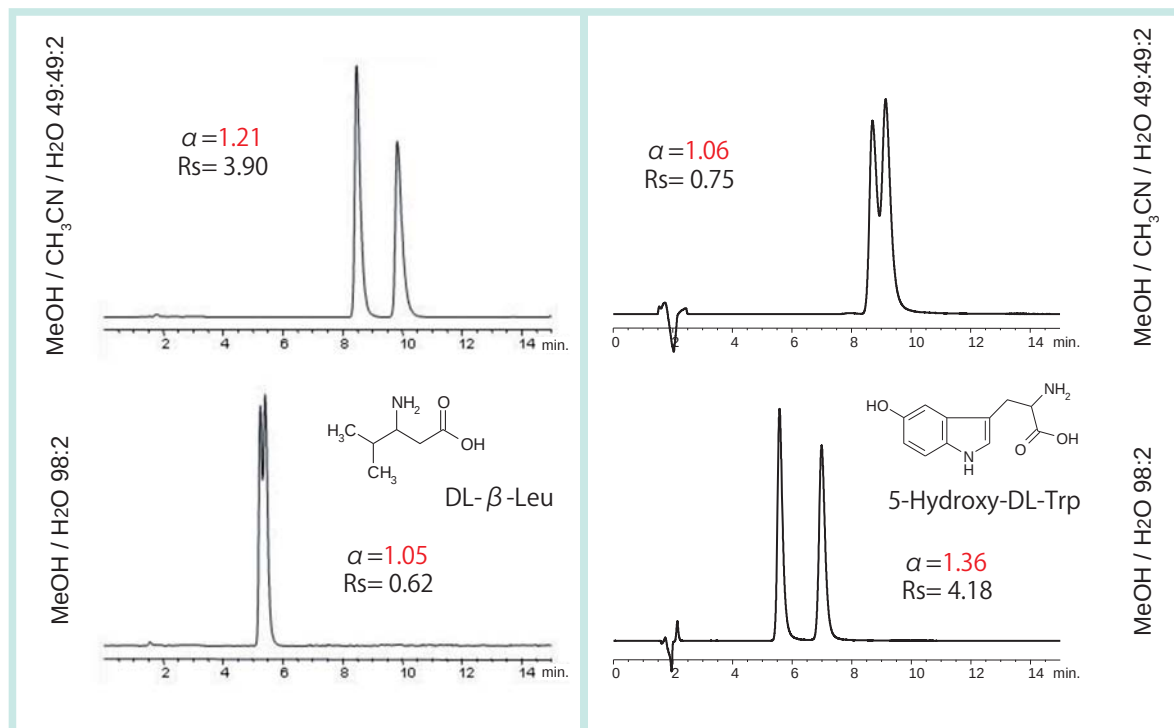
添加剤： 上記の混合溶媒にギ酸 1.9mL とジエチルアミン 2.6mL を加える。

図1 分析条件決定フローチャート



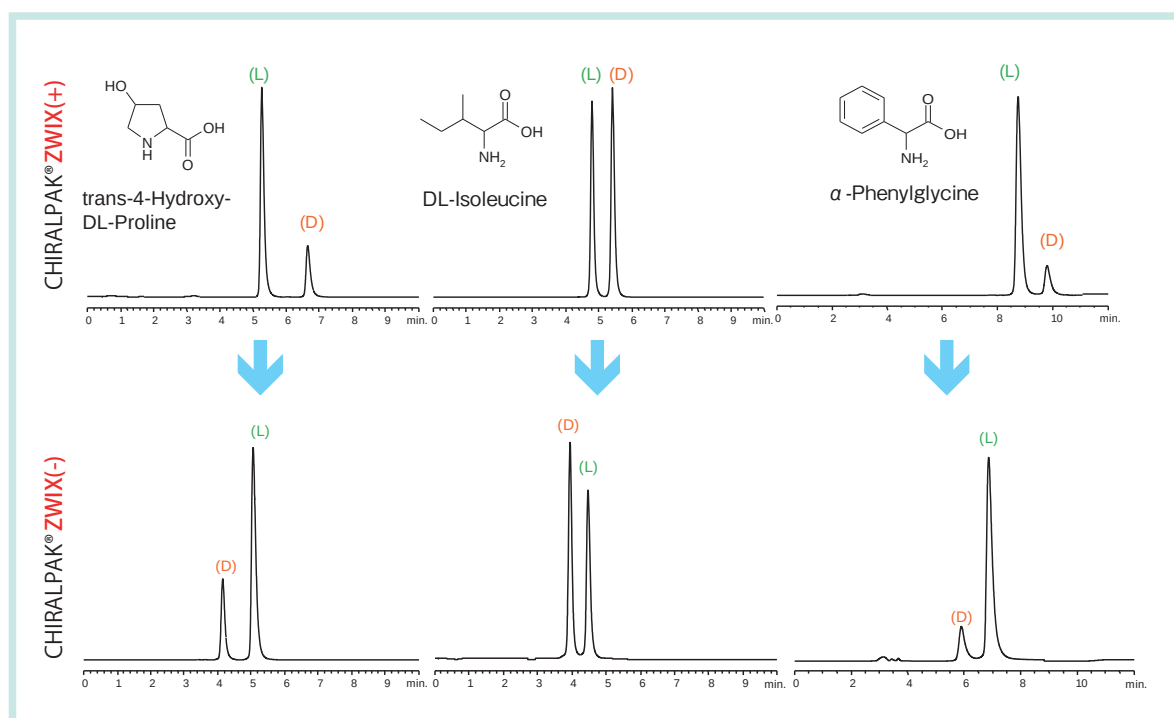
6.2.2 溶剤の影響

移動相の溶出力は一般的に $\text{CH}_3\text{CN}/\text{MeOH} < \text{MeOH} < \text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ の順で溶出力が強くなります。また、有機溶媒種によって選択性が大きく変化することがあります。



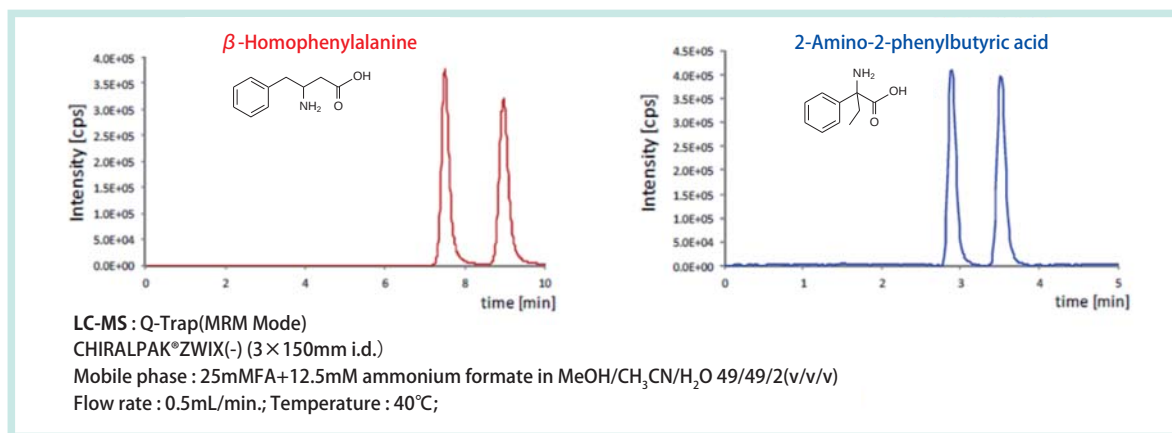
6.2.3 溶出順序の変更

ZWIX(+) と ZWIX(-) の使い分けにより、化合物の溶出順序の逆転させることが可能です。ただし、セクターが擬似的な光学異性体の関係であるため、化合物によっては順序が逆転しない場合があります。



6.2.4 LC-MS への応用について

酸・塩基の添加剤として、ギ酸 / ギ酸アンモニウムなどを使用することにより、LC-MS に適した移動相として分析することが可能です。



6.3 CHIRALPAK® ZWIX を用いた分離例

6.3.1 アミノ酸(フリー体)の分離例

DL-Amino acid	カラム	移動相	検出	分離	Rs	溶出順序
Alanine	ZWIX(+)*1	A	ELSD	◎	2.7	L/D
Arginine	ZWIX(+)*2	B	ELSD	◎	1.9	D/L
Asparagine	ZWIX(+)*1	C	ELSD	◎	4.3	L/D
Aspartic acid	ZWIX(+)*1	B	ELSD	×	0.5	—
Cysteine	ZWIX(-)*1	D	ELSD	◎	3.2	D/L
Glutamic acid	ZWIX(+)*1	B	ELSD	○	1.3	D/L
Glutamine	ZWIX(+)*1	D	ELSD	◎	3.2	L/D
Histidine	ZWIX(+)*1	B	ELSD	◎	2.5	L/D
Isoleucine	ZWIX(+)*1	A	ELSD	◎	4.6	L/D
Leucine	ZWIX(+)*1	A	ELSD	◎	3.6	L/D
Lysine	ZWIX(+)*1	B	ELSD	◎	1.8	L/D
Methionine	ZWIX(+)*1	A	ELSD	◎	2.8	L/D
Phenylalanine	ZWIX(+)*1	A	UV254nm	◎	2.6	L/D
Proline	ZWIX(+)*1	A	ELSD	◎	10.0	L/D
Serine	ZWIX(+)*1	D	ELSD	△	1.0	—
Tryptophan	ZWIX(+)*1	B	UV254nm	◎	5.9	D/L
Tyrosine	ZWIX(+)*1	A	UV270nm	◎	2.9	L/D
Threonine	ZWIX(+)*1	A	ELSD	◎	4.0	L/D
Valine	ZWIX(+)*1	A	ELSD	◎	4.3	L/D

カラムサイズ
*1 : 3.0×150mm, *2 : 4.0×250mm

移動相
A : MeOH/CH₃CN/H₂O = 49/49/2 (v/v/v)
50mM FA + 25mM DEA
B : MeOH/H₂O = 98/2 (v/v)
50mM FA + 25mM DEA
C : MeOH/CH₃CN = 50/50 (v/v)
50mM FA + 25mM DEA
D : MeOH/THF/H₂O = 49/49/2 (v/v/v)
50mM FA + 25mM DEA

流速 : 0.5mL/min., 温度 25°C

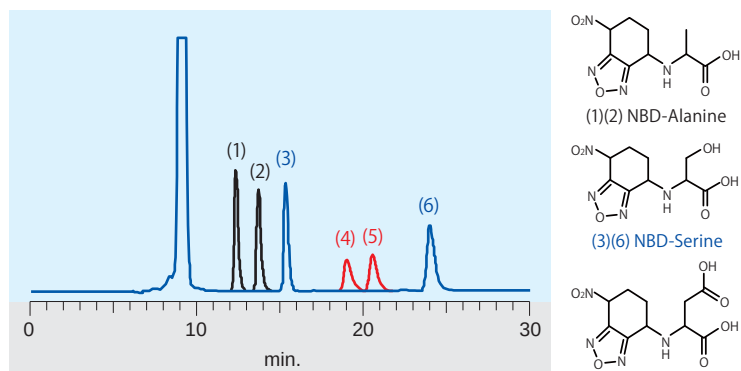
分離
◎ : ベースライン分離
○ : ほぼベースライン分離
△ : 部分分離
× : 分割せず

MeOH : メタノール
CH₃CN : アセトニトリル
FA : ギ酸
DEA : ジエチルアミン
THF : テトラヒドロフラン

6.3.2 誘導体化したアミノ酸の分離例

アミノ基を NBD-F で蛍光誘導体化したアミノ酸の分離例です。
フリーアミノ酸または誘導体化アミノ酸を、数種同時に分離することもできます。

Column : CHIRALPAK® ZWIX(+) 4.0×250mm
Mobile phase : MeOH/CH₃CN/H₂O = 49/49/2 (v/v/v)
50mM FA + 25mM DEA
Flow rate : 0.40 mL/min.
Temperature : 25°C
Detection : UV470nm



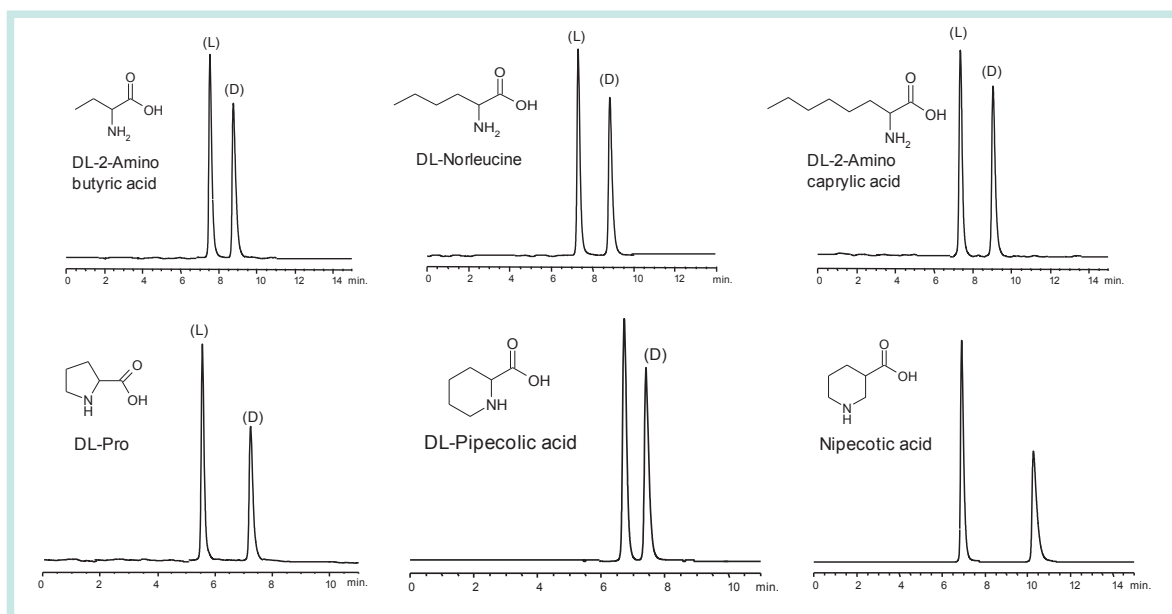
NBD-F : 4-フルオロ-7-ニトロ-2,1,3-ベンゾキサジアゾール

サンプル提供 : 株式会社日立ハイテクノロジーズ様

(4)(5) NBD-Aspartic acid

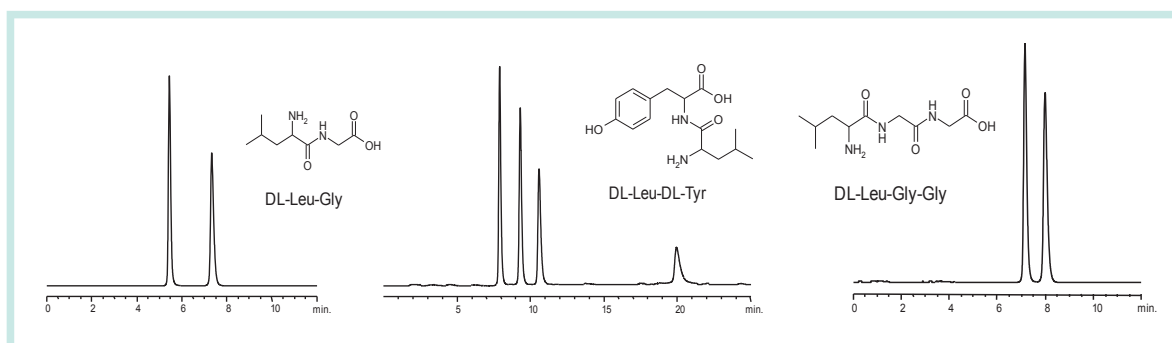
6.3.3 環状2級アミノ酸およびアルキル側鎖を持つアミノ酸の分離例

カラム CHIRALPAK® ZWIX(+), カラムサイズ 3×250 mm, 流速 0.50 mL/min, カラム温度 25℃, 検出器 ELSD



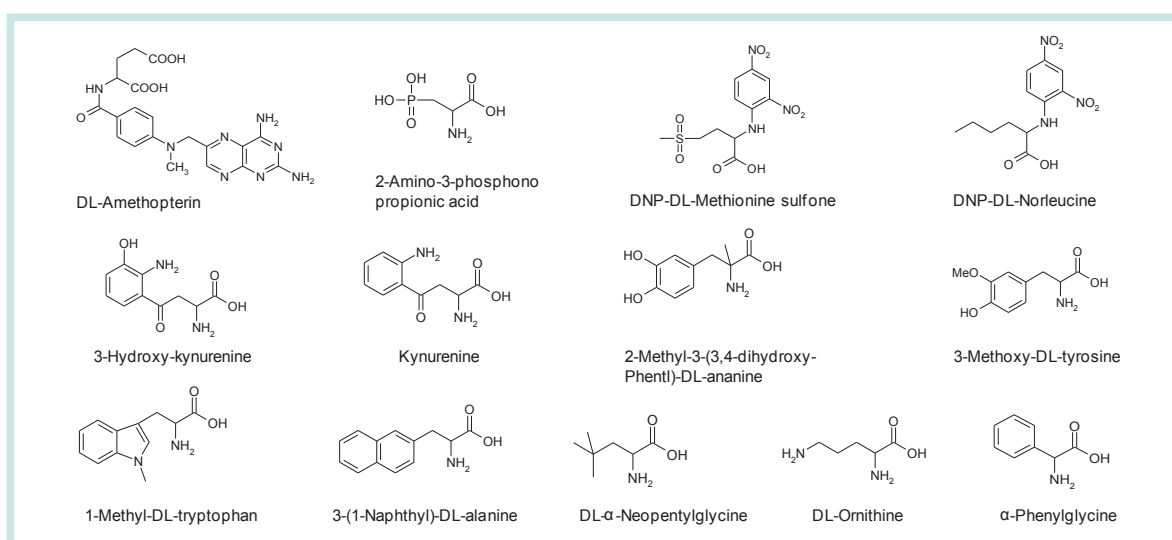
6.3.4 ジペプチド、トリペプチドの分離例

カラム CHIRALPAK® ZWIX(+), カラムサイズ 3×250 mm, 流速 0.50 mL/min, カラム温度 25℃, 検出器 ELSD



6.3.5 その他、分離可能な化合物

カラム CHIRALPAK® ZWIX(+), カラムサイズ 3×250 mm, 流速 0.50 mL/min, カラム温度 25℃, 検出器 ELSD



7章 タンパク質結合型キラルカラム 編

CHIRALPAK® AGP CHIRALPAK® CBH CHIRALPAK® HSA

【特長】

- ・キラルセクターであるタンパク質を基材のシリカゲルに結合したものを充填剤としたキラルカラムです。
- ・多糖誘導体キラルカラムで分離できなかった化合物に対して、タンパク質結合型キラルカラムが有効な場合があります。
- ・移動相には、リン酸緩衝液や酢酸系の緩衝液をご使用下さい。
- ・タンパク質結合型キラルカラムとして、分離対象化合物の異なる3タイプを取り揃えています。

7章 両性化合物分析用キラルカラム 編

7.1	はじめに	59
7.1.1	カラムの仕様	59
7.1.2	カラム使用条件	59
7.1.3	使用可能溶媒	60
7.1.4	カラム保護パーツ	60
7.1.5	サンプルの前処理	60
7.1.6	装置の洗浄	60
7.1.7	注意事項	60
7.1.8	平衡化	60
7.2	分析条件設定方法	60
7.2.1	移動相の初期条件	60
7.2.2	緩衝液の調整方法	60
7.2.3	移動相	61
7.2.4	試料	61
7.2.5	カラムの洗浄・保管	61
7.3	CHIRALPAK®AGP の分析条件設定方法	62
7.3.1	分析条件設定までの流れ	62
7.3.2	最適化条件の例 (pH)	63
7.3.3	最適化条件の例 (有機溶媒比率)	64
7.3.4	最適化条件の例 (有機溶媒種)	64
7.3.5	最適化条件の例 (バッファー濃度)	65
7.3.6	最適化条件の例 (添加剤種)	65

7.1 はじめに

7.1.1 カラムの仕様

CHIRALPAK® AGP

カラムエンド： ウォーターズタイプ
不斉識別剤： α 1- 酸性糖タンパク質
粒径： $5\mu\text{m}$
出荷時の封入溶媒： 水 / 2- プロパノール = 85/15 (v/v)

CHIRALPAK® CBH

カラムエンド： ウォーターズタイプ
不斉識別剤： セロビオヒドロラーゼ
粒径： $5\mu\text{m}$
出荷時の封入溶媒： 水 / 2- プロパノール = 85/15 (v/v)

CHIRALPAK® HSA

カラムエンド： ウォーターズタイプ
不斉識別剤： ヒト血清アルブミン
粒径： $5\mu\text{m}$
出荷時の封入溶媒： 水 / 2- プロパノール = 90/10 (v/v)

7.1.2 カラム使用条件

タンパク質結合型キラルカラム（CHIRALPAK® AGP、CBH、HSA）は以下の条件でご使用下さい

カラムサイズ (内径 × 長さ)	2.0×50mm 2.0×100mm 2.0×150mm 分析用カラム	3.0×50mm 3.0×100mm 3.0×150mm 分析用カラム	4.0×50mm 4.0×100mm 4.0×150mm 分析用カラム	10×100mm 10×150mm セミ分取用カラム
通液方向	カラムのタグに明示されています。			
一般的な流量	0.2mL/min	0.5mL/min	0.9mL/min	4.0mL/min
圧力*	カラムを長くお使い頂くため、10MPa (～ 102 kgf/cm ²) を超えない圧力での使用を推奨します。			
pH	pH 4.0 ～ 7.0			
推奨温度範囲	20 ～ 30℃			
有機溶媒比率	0 ～ 15% (体積比)			
緩衝液の温度	0 ～ 100mM (推奨範囲：10 ～ 20mM)			
添加剤量	0 ～ 10mM			

※圧力とは、カラム自体にかかる背圧の最大値のことです。この背圧は、カラムを HPLC 装置に接続し、通液した場合の系内全体の圧力から、同条件でカラムを接続しない場合の系内全体の圧力を差し引いた値になります。

7.1.3 使用可能溶媒

タンパク質結合型キラルカラムは、移動相やサンプル溶解液に様々な有機溶媒を使用することができます。

- ・ 2-プロパノール
- ・ アセトニトリル
- ・ エタノール
- ・ メタノール

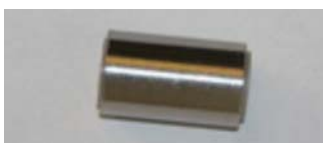
※上記以外の有機溶媒をご利用したい場合、弊社にお問合せ下さい。

7.1.4 カラム保護パーツ

タンパク質結合型キラルカラムは、移動相やサンプル溶解液に様々な有機溶媒を使用することができます。



専用ガードカートリッジホルダー
(製品番号：00081)



ガードカートリッジ

ガードカートリッジを使用するためには、ガードカートリッジホルダー (00081) が必要です。
ガードカートリッジホルダーにガードカートリッジをセットし、短い配管を用いて本カラムの前に接続してください。

7.1.5 サンプルの前処理

カラムの目詰まりによる圧力の上昇を防ぎ、カラムをより長くお使い頂くために、サンプル及び移動相を使用する前に、0.5 μ m 程度のメンブレンフィルターにて濾過して下さい。

7.1.6 装置の洗浄

本カラムはタンパク質をシリカゲルに化学結合した充填剤を使用しております。そのため使用可能な移動相以外の溶媒を使用、または混入した場合、充填剤のタンパク質を変性させ、カラム性能を損なわせます。使用前に、使用可能な移動相にて HPLC 装置内（サンプルループ、インジェクションループ等）で十分に置換してください。

7.1.7 注意事項

- ・カラムに強い衝撃を与えたり、カラムを分解しないで下さい。
 - ・カラムを長くお使い頂くために、専用のガードカートリッジをご使用下さい。
- 特に、生体成分の分析をされる場合は、ガードカートリッジを定期的に交換してください。

7.1.8 平衡化

本カラムは出荷時に水 / 2- プロパノール = 85/15 (v/v) が封入されています。使用にあたっては、下記条件でカラムを置換した後、使用する移動相を通液し、ベースラインが安定するまで平衡化してください。

水 (HPLC グレード) 置換

(1) HPLC 装置を水に置換します。カラムを HPLC 装置に接続し、0.1mL/min で通液を開始し、約 1 分で 0.5mL/min まで徐々に流速を上げて下さい。そのまま流速 0.5mL/min で約 2 分間通液し、さらに 0.8 ~ 0.9mL/min まで流速を上げて約 10 分間通液して下さい。(4mm 内径の場合の流速です。2mm 内径、3mm 内径のカラムをご使用の場合は、線速が同じになるよう設定してください。)

(2) その後、使用移動相でカラム平衡化を行って下さい。

7.2 分析条件設定方法

タンパク質結合型キラルカラムは、タンパク質をシリカゲルに化学結合した充填剤を使用しております。そのため 3-1-3. の項に記載された移動相及び試料溶媒の使用・混入は充填剤のタンパク質を変性させ、カラム性能を損なわせます。使用の前に、HPLC 装置内やサンプルループ等を使用可能移動相で十分置換してください。

7.2.1 移動相の初期条件

	酸性化合物	中性化合物	塩基性化合物
初期条件	10mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.8)* / 2- プロパノール = 95 / 5 (v/v)		

*緩衝液の調製法をご参照下さい。

7.2.2 緩衝液の調製方法

10mM 酢酸アンモニウム緩衝液の調製 (1L 調製)

- ① 酢酸アンモニウム ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$, 純度 $\geq 99\%$) 770.8mg をビーカーに量り取る。
- ② 水 (HPLC グレード) 約 800mL を加え、室温 (20 ~ 25°C) で溶解させる。
- ③ 希釈した酢酸もしくはアンモニウム水溶液で調整したい pH に合わせる。
- ④ 0.22 μ m のフィルターを通してから、1L メスフラスコに入れる。
- ⑤ 1L メスフラスコの標線まで水を加え、密栓後、均一になるまでよく混ぜる。

緩衝液を有機溶媒と混合して使用する場合は、メスフラスコまたはメスピペットを使って、容積で測定してください。混合した後、移動相は超音波槽で脱気して下さい。

移動相にイオン性添加剤を加える際には、イオン性添加剤を pH 調整前に加えてください。

7.2.3 移動相

有機溶媒含有量が少ないか、もしくは含まれない移動相中では、微生物が繁殖しやすくなります。そのような移動相を使用する場合には、使用直前に移動相調製をして下さい。

緩衝液

酢酸アンモニウムの濃度は、通常 10 ~ 20mM で使用しますが、100mM まで使用できます。他の種類の緩衝液 (リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、酢酸ナトリウム緩衝液、ギ酸塩緩衝液、クエン酸塩緩衝液など) も使用することができますが、LC-MS 測定には、適さない場合があります。

有機溶媒

2- プロパノールが最もよく使用されますが、メタノール、エタノール、アセトニトリルも使用することができます。一般に、有機溶媒の溶出力は、2- プロパノール > エタノール ≧ アセトニトリル > メタノールの順です。

イオン性添加剤

保持時間やキラル識別を調製するために、N,N- ジメチルオクチルアミン (DMOA), トリフルオロ酢酸 (TFA), オクタン酸 (OA), ヘプタフルオロ酪酸 (HFBA) といったカチオン性やアニオン性の添加剤を、低濃度 ($\leq 10\text{mM}$) で使用することもできます。しかし、これらの添加剤は、固定相に強く吸着し、カラム性能に影響を及ぼすことがあります。移動相にイオン性添加剤を使用した場合は、イオン性添加剤専用のカラムとして使用することをお勧めします。

注意: OA や DMOA の水への混和性は低く、常温では 2mM OA、5mM DMOA が 均一に混和できる上限となります。これ以上の濃度では、相分離が起きる可能性があります。

7.2.4 試料

- ・ 試料の注入量は可能な限り少なくしてください。推奨のサンプル濃度は 0.20mg/mL 以下、打ち込み量は 5 ~ 10 μL です。
- ・ また試料は可能な限り移動相に溶かしてください。もし十分溶解しない場合には、なるべく少量の有機溶剤を添加して溶解させてください。試料溶液は、0.5 μm 程度のメンブレンフィルターで濾過してからご使用下さい。

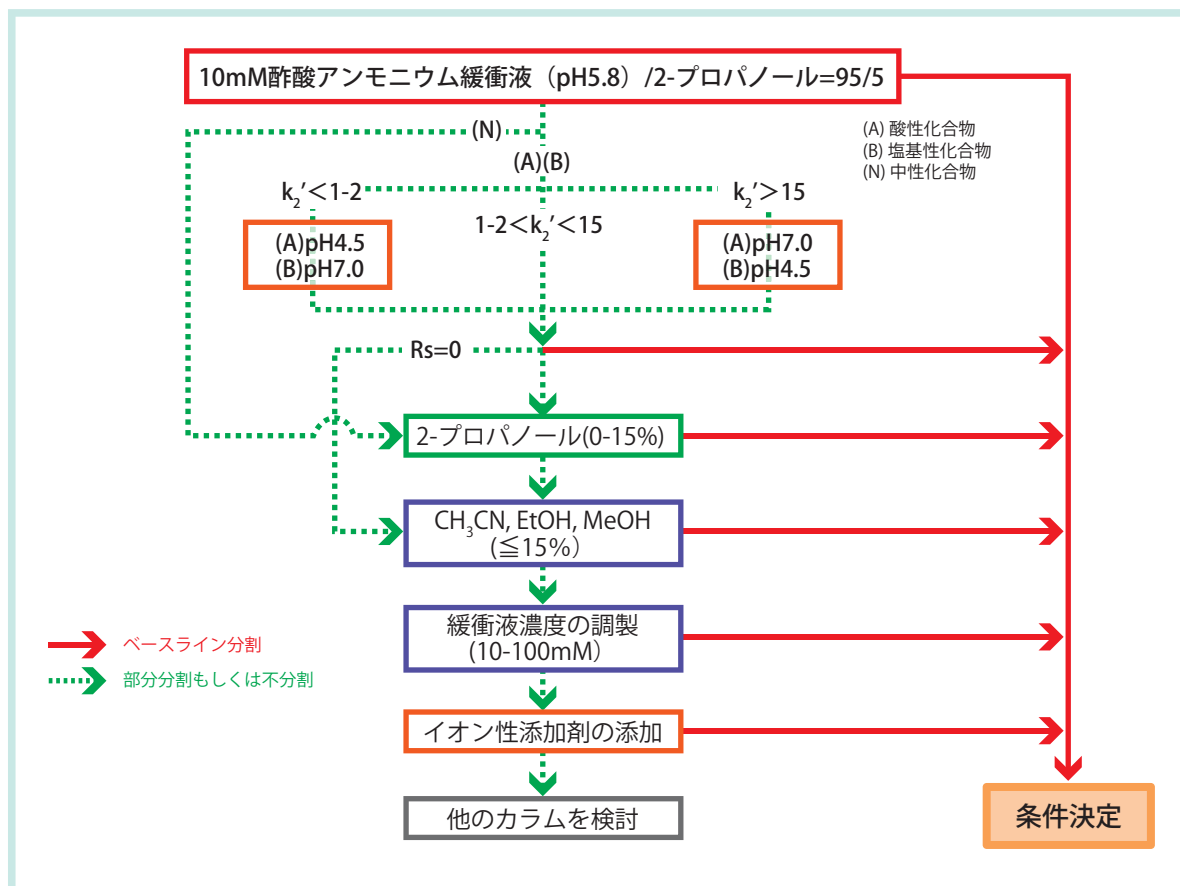
注意: サンプルを 100% もしくは高濃度の有機溶媒に溶解させると、注入後にサンプルが析出し、装置配管を詰まらせる原因となります。不溶解物を含む溶液は打ち込まないで下さい。

7.2.5 カラムの洗浄・保管

- ・ 疎水性の強い化合物を分析し、カラムへ吸着した場合は、検出器には繋がず、通常のカラム通液方向とは逆向きに 水 / 2- プロパノール = 75/25(v/v) を低流速 (内径 4mm のカラムの場合 0.3mL/min.) で一晩通液してください。
- ・ カラム使用後、HPLC 装置から取り外す前に、塩もしくは緩衝液を含まない移動相 (例: 水 / 2- プロパノール = 90/10(v/v)) でカラムを洗浄してください。
- ・ カラムを保存する場合は、水 / 2- プロパノール = 85/15(v/v) で封止することを推奨します。短期間 (週末など) の保管では常温 (< 30°C)、長期間にわたる場合は冷蔵で保管することを推奨します。

7.3 CHIRALPAK® AGP の分析条件設定方法

7.3.1 分析条件設定までの流れ

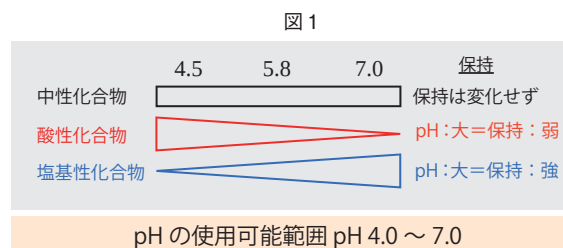


参考：分離に影響を及ぼすパラメーター（推奨検討順）

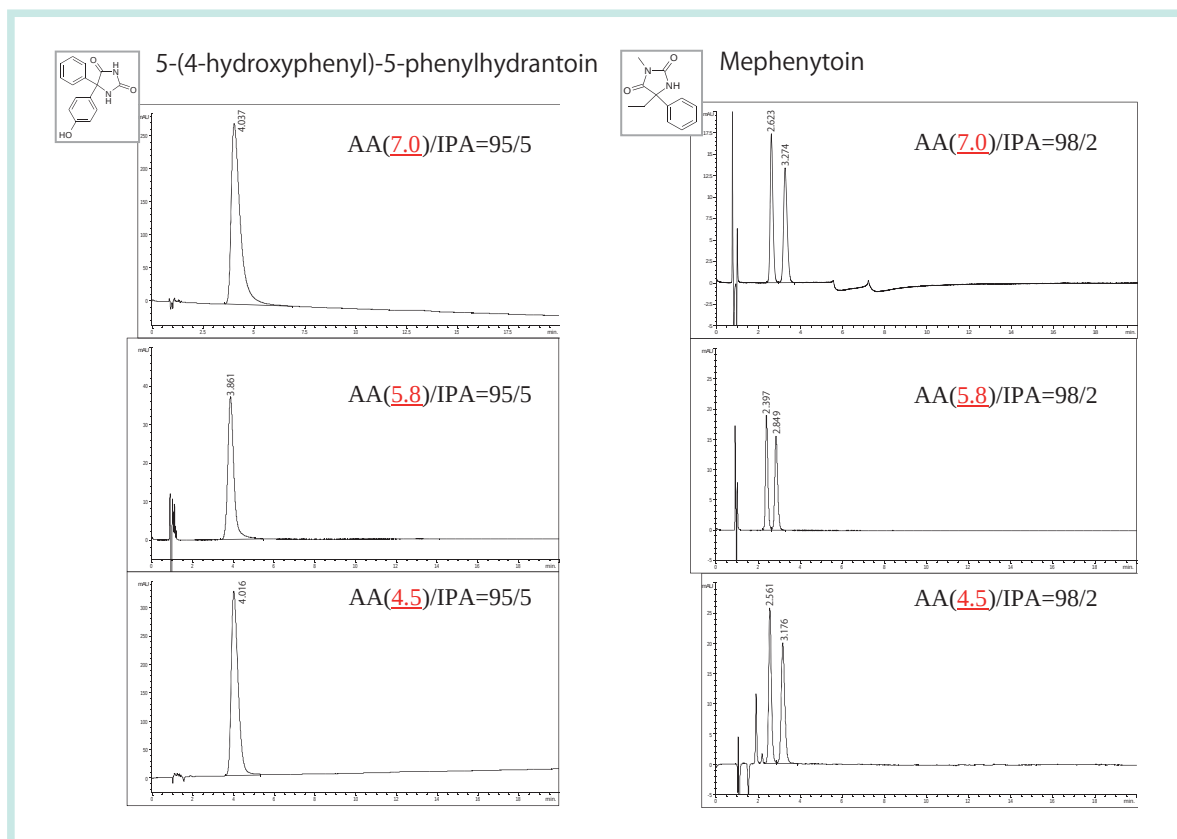
- | | |
|-------------|------------------------|
| (1) pH | (使用可能範囲：4-7) |
| (2) 有機溶媒比 | (使用可能範囲：≤15%) |
| (3) 有機溶媒種 | (使用可能溶媒：アルコール、アセトニトリル) |
| (4) バッファー濃度 | (使用可能範囲：≤100mM) |
| (5) 添加剤 | (使用可能範囲：≤10mM) |

7.3.2 最適化条件の例 (pH)

CHIRALPAK® AGP は移動相の pH を変化させることによって、化合物の保持をコントロールすることができます。図 1 に移動相 pH に伴う保持の挙動を示しています。中性化合物については、保持挙動に変化はありませんが、酸性化合物においては **pH を高くすると保持が弱くなります**。反対に塩基性化合物においては、**pH を高くすると保持が強くなります**。



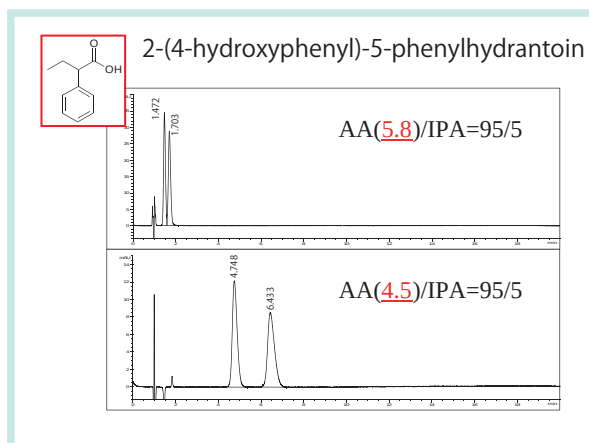
① 中性化合物の場合



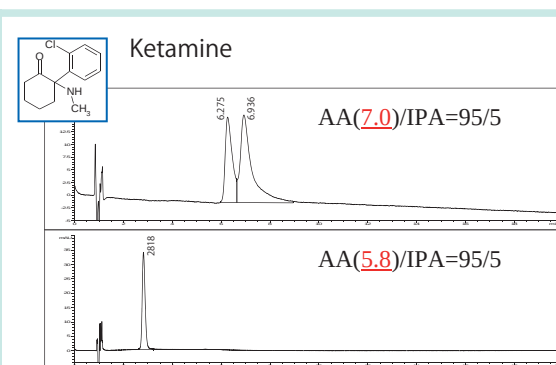
AA:酢酸アンモニウム緩衝液

中性化合物は、pH の影響を受けません。pH を変化させても保持は変わりません

② 酸性化合物の場合



③ 塩基性化合物の場合



AA:酢酸アンモニウム緩衝液

酸性化合物は、pH を上げると保持は弱くなります。

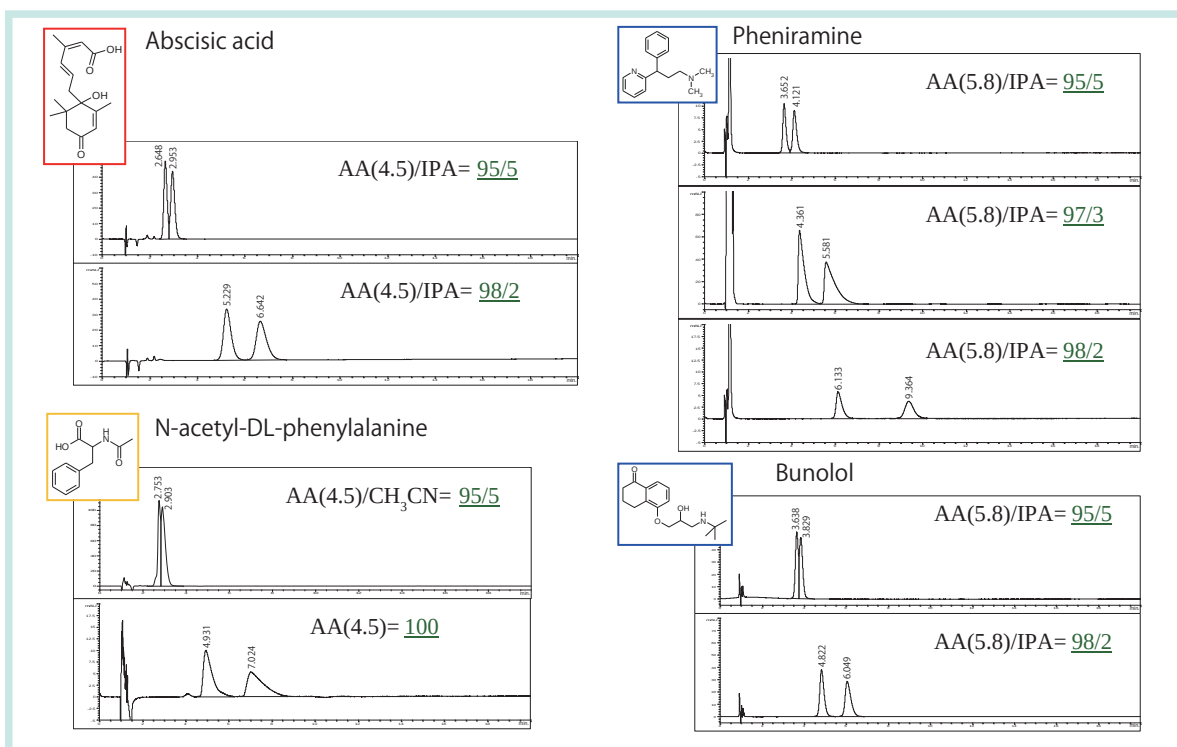
塩基性化合物は、pH を上げると保持は強くなります。

7.3.3 最適化条件の例（有機溶媒比率）

CHIRALPAK® AGP は移動相の有機溶媒比率の変化により、保持が変化します。

有機溶媒比率を下げることで保持は大きくなり、逆に有機溶媒比率を下げることで保持は小さくなります。

有機溶媒比率の使用範囲 0 ~ 15% (体積比)



適度な保持時間 ($1 < k'_2 < 15$) で完全分離が得られない場合、有機溶媒比を下げることで、保持が強くなり、分離向上が期待できます。

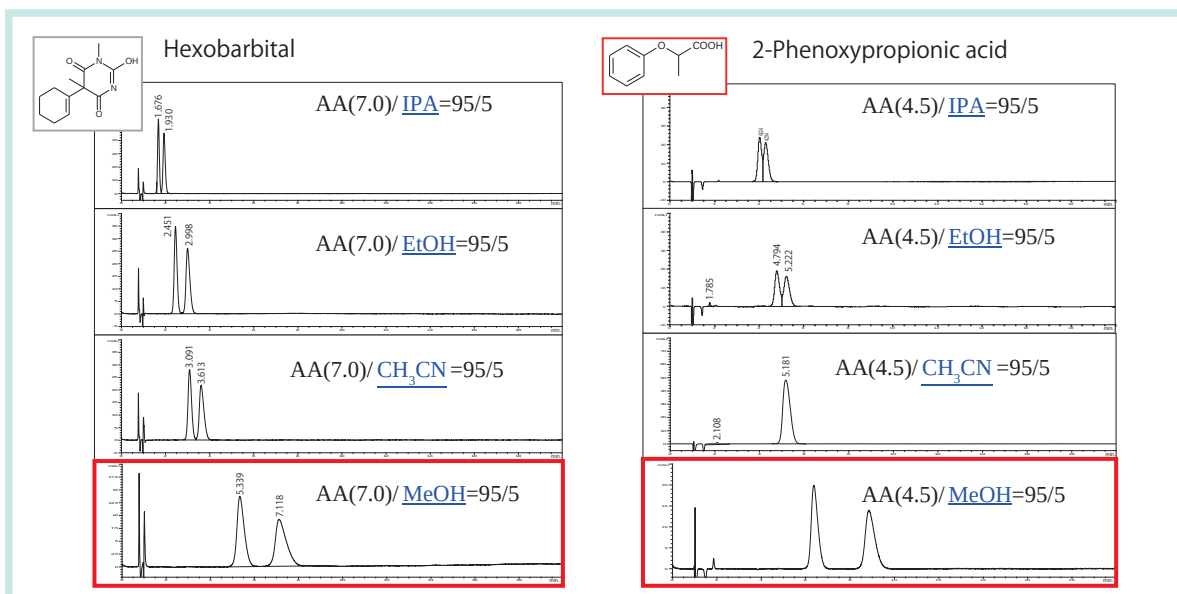
AA:酢酸アンモニウム緩衝液

7.3.4 最適化条件の例（有機溶媒種）

CHIRALPAK® AGP は移動相の有機溶媒比率の変化により、保持が変化します。

有機溶媒比率を下げることで保持は大きくなり、逆に有機溶媒比率を下げることで保持は小さくなります。

溶出力: IPA > EtOH > CH₃CN > MeOH



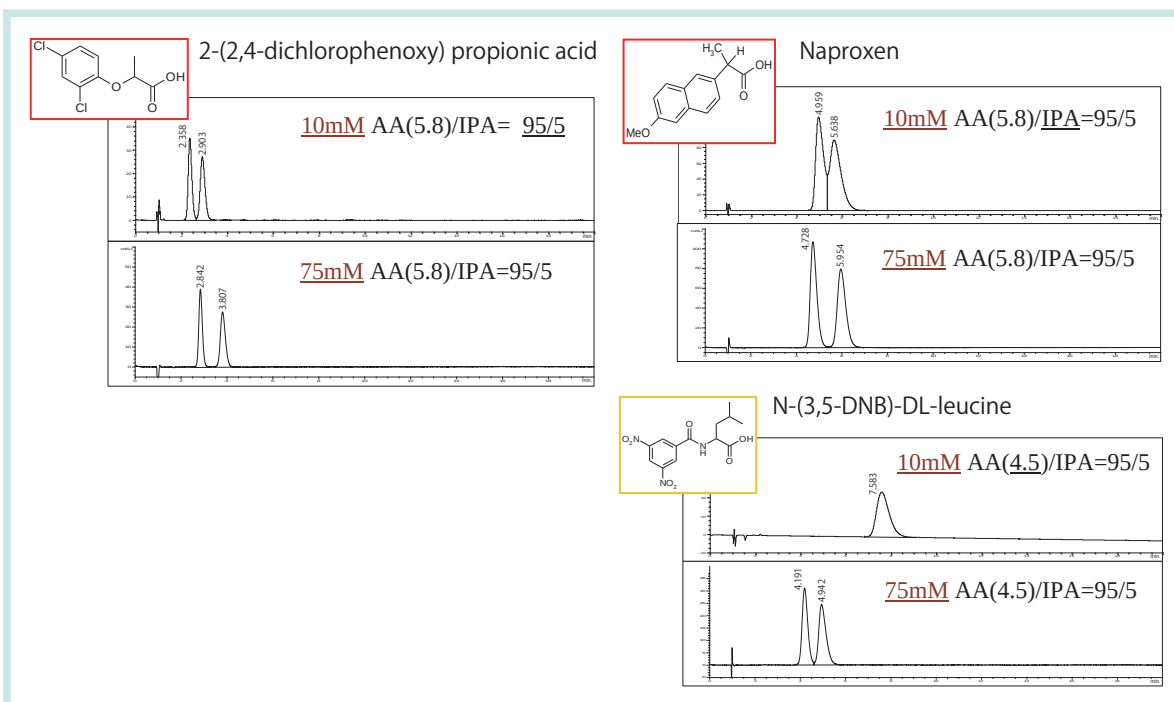
適度な保持時間 ($1 < k'_2 < 15$) で完全分離が得られない場合、有機溶媒を変えることで、保持が強くなり、または分離特性が変化し、分離向上が期待できます。

AA:酢酸アンモニウム緩衝液

7.3.5 最適化条件の例（バッファー濃度）

pH や有機溶媒比・種類を変更しても完全分離が得られない場合、バッファー濃度を上げることで、分離向上が期待できます。

バッファー濃度の使用範囲 ≤ 100 mM

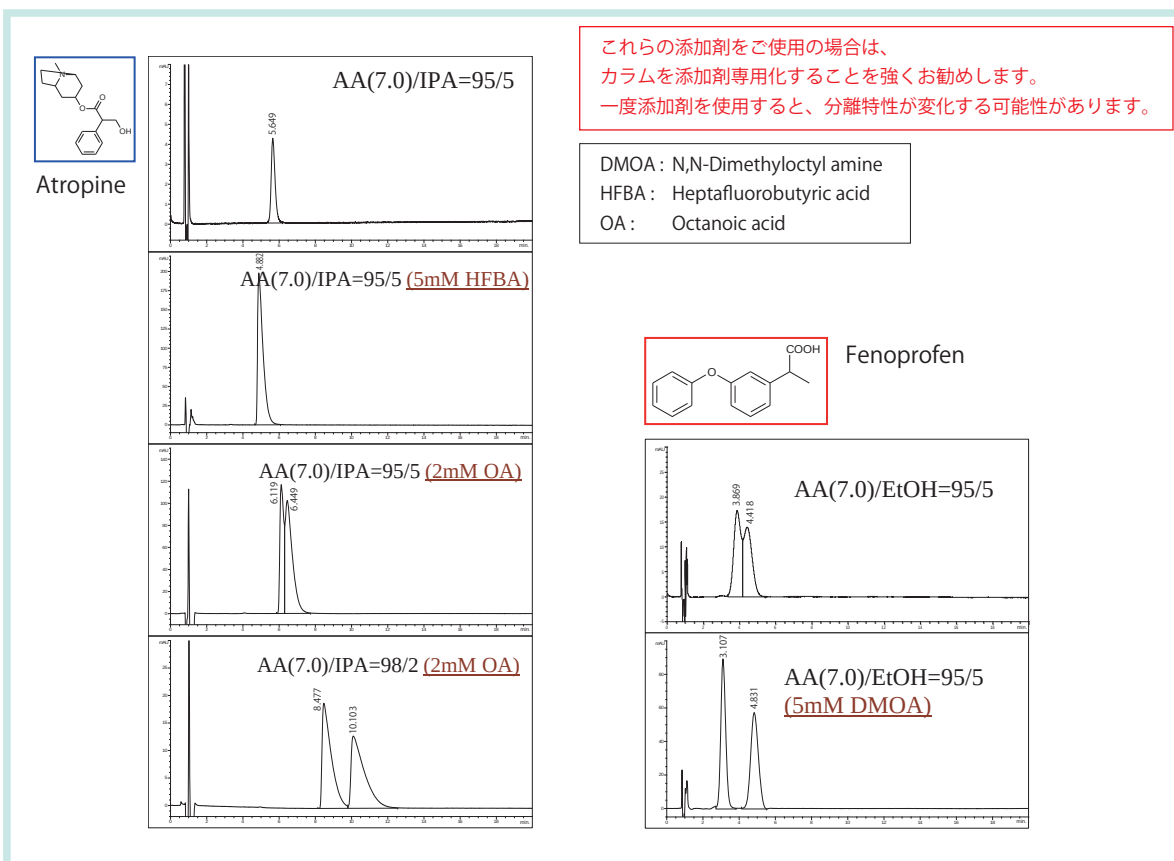


AA:酢酸アンモニウム緩衝液

7.3.6 最適化条件の例（添加剤種）

pH や有機溶媒比・種類、バッファー濃度を変更しても完全分離が得られない場合、添加剤を用いることで、分離向上が期待できます。

添加剤濃度の使用範囲 ≤ 10 mM



AA:酢酸アンモニウム緩衝液

株式会社ダイセル CPIカンパニー

■ 東日本：〒108-8230 東京都港区港南2-18-1 JR品川イーストビル14F
TEL: 03-6711-8222 (直) FAX: 03-6711-8228

■ 西日本：〒530-0011 大阪市北区大深町3番1号 グランフロント大阪 (タワーB)
TEL: 06-7639-7221 (直) FAX: 06-7639-7228

■ <http://www.daicelchiral.com/> E-mail: chiral@jp.daicel.com

■ アメリカ 問合わせ先 E-mail: chiral@chiraltech.com

■ ヨーロッパ 問合わせ先 E-mail: cte@chiral.fr

■ アジア 問合わせ先

(中国) E-mail: chiral@ctc.daicel.com

(インド) E-mail: chiral@chiral.daicel.com